Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 10-25154

54. **TÍTULO** LAMINADO QUE TIENE PROPIEDADES LIMPIADORAS MEJORADAS Y UN METODO PARA PRODUCIR EL LAMINADO

NO

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** SCA HYGIENE PRODUCTS AB

DOMICILIO GOTEBORG, SUECIA

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,**

(FORMA P-10)

Tilde. Cm
Fn 06-03-2010

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-025154- -00000-0000
Fecha: 2010-03-03 16:49:12 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 330

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH**
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Alemania.

Dirección: Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim Am Rhein, Alemania

Domicilio: Ingelheim Am Rhein, Alemania

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 35.456.344 T.P 23.555

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **Hilda Elizabeth SMITH**
Golfpark 98,
8241 AG Lelystad,
Holanda

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/NL2008/050537 Fecha: 5 de agosto de 2008
Publicación Internacional No. WO 2009/020391 A1 Fecha: 12 de febrero de 2009

6 Título (54)

PROTEÍNAS DE *STREPTOCOCCUS* INMUNOGÉNICAS (Folio 335)

7 Clasificación Internacional (51) G01N 033/569

8 Prioridad SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
EP	6 de agosto de 2007	07113844.0

9 Comprobante de pago No.: 10-12,229 **Fecha:** 15 de febrero de 2010
10-12,318 15 de febrero de 2010
10-12,319 15 de febrero de 2010
10-12,341 15 de febrero de 2010
10-14,431 22 de febrero de 2010

10

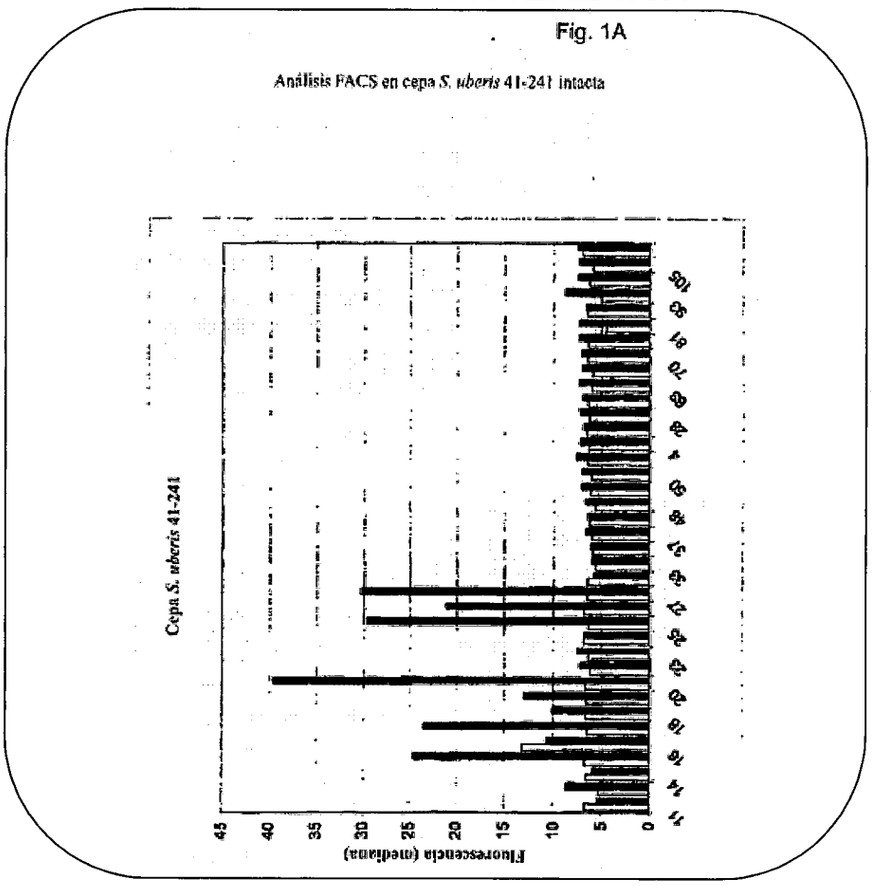
Anexos:

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 554.000.oo.
- [x] Comprobante de pago por 55 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por $1.430.000.oo.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [x] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

Fig. 1A



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : Luz Clemencia de Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

JGG

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2009/020391 A1

   Descripción:

   Páginas 89 en el idioma original

   Páginas 104 en español

   Reivindicaciones: Número (s) 65

   Figuras: Número (s) 4

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Listado de Secuencias.

3. ☒ Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO S..KI
CARRERA 4ª Nº 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

5

Für Patente, Modelle, Muster, Warenzeichen, Dienstleistungsmarken, Handelsnamen und Embleme.

Para patentes, modelos y dibujos; marcas de fábrica y de servicios; nombres comerciales y enseñas.

REPRESENTACION Y PODER

VERTRETUNG UND VOLLMACHT

4484
0569

ICH (wir) Unterzeichnende (r) / Yo (nosotros), abajo firmado (s)
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

wohnhaft in / domiciliado (s) en D-55216 Ingelheim am Rhein
Federal Republic of Germany

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª Nº 72-35, Bogotá, Colombia, en obedecimiento a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos;

ernenne(n) hiermit in Übereinstimmung mit Abs. 1 des Artikels 543 des Handelsgesetzbuches GERMAN CAVELIER (Rechtsanwaltsausweis Nr. 832), GONZALO PERDOMO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 831), EMILIO FERRERO (Rechtsanwaltsausweis Nr. 31929) und LUZ CLEMENCIA DE PAEZ (Rechtsanwaltsausweis Nr. 23555), mit Geschäftssitz in Bogotá/Kolumbien, Carrera 4ª Nº 72-35 zu meinen (unseren) Prozeßbevollmächtigten (Germán CAVELIER zum Hauptbevollmächtigten, die anderen - in der genannten Reihenfolge - zu seinen Stellvertretern) in allen Angelegenheiten, die das Gewerbliche Eigentum betreffen. Sie sind befugt, Zustellungen entgegenzunehmen und Prozeßbevollmächtigten und außergerichtliche Bevollmächtigte zu ernennen. Der erste Stellvertreter hat Herrn GERMAN CAVELIER bei dessen Abwesenheit oder im Falle einer vorübergehenden oder endgültigen Verhinderung zu vertreten. Dasselbe gilt, wenn der zweite Stellvertreter den ersten, oder aber der dritte den zweiten, zu vertreten hat. In diesen Fällen wird der Hauptvertreter, oder gegebenenfalls der erste oder zweite Stellvertreter, oder beide, in Form einer durch einen Notar (in Kolumbien) oder durch einen Notar oder sonstigen öffentlichen Beamten oder Konsul von Kolumbien (im Ausland) beglaubigten Erklärung seine Absicht, die Vertretung nicht auszuüben, zum Ausdruck bringen. Sollte eine Verhinderung der Grund dafür sein, ist die entsprechende Bescheinigung beizufügen. Sollte einer der Ernannten endgültig ausscheiden, nimmt der Nachfolgende seine Stelle ein. Bei Beendigung der Abwesenheit oder Verhinderung des Hauptvertreters oder seines ersten oder zweiten Stellvertreters, können GERMAN CAVELIER oder aber - je nach Fall die entsprechenden Stellvertreter, die Vertretung ohne weiteres wieder übernehmen und die jeweilige Stellvertretung gilt als aufgehoben.

Außerdem erteile ich (erteilen wir) den oben genannten Rechtsanwälten die Vollmacht, den Schutz meines (unseres) Gewerblichen Eigentums und bei Unlauterem Wettbewerb zu erlangen. Zu diesem Zweck ermächtigen wir die genannten Bevollmächtigten zur Vertretung vor sämtlichen Stellen oder Personen, gleichgültig ob diese rechtsprechende Gewalt ausüben oder nicht, vor allem vor den Verwaltungsbehörden, vor der Verwaltungsgerichtsbarkeit und Gerichten, als auch vor den Schiedsgerichten und zwar in allen Fragen, die sich auf folgende Angelegenheiten beziehen: a) Erlangung von Patenten für Erfindungen, Gebrauchsmustern, Industriezeichnungen, die Eintragung von Warenzeichen, Verbandszeichen, Defensivmarken, Dienstleistungsmarken, Werbeslogans, Handelsnamen und Emblemen, Gemüsearten und

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
02 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

A la vuelta ⟶

Weiter ⟶

© CAVELIER ABOGADOS

acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituír este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Herkunftsbezeichnungen, ihre Erneuerung, Übertragung Änderung des Namens oder des Geschäftssitzes, den freiwilligen Verzicht und die Eintragung von Nutzungslizenzen für diese Rechte; b) Klagen wegen Unlauterkeit im Wettbewerb, Verbraucherschutz, Widersprüchen und Einsprüchen, verwaltungsrechtlicher und gerichtlicher Löschung, Nichtigkeit, einstweiligen Verfügungen Konzessionen v Lizenzen, der "tutela" und allgemein für zivil-, straf- u verwaltungsrechtlichen und verwaltungsgerichtlichen Prozessen, die mit diesen Rechten in Verbindung stehen und die wir betreiben oder die gegen uns anhängig gemacht werden. Wir ermächtigen sie ebenfalls dazu, in allen oben genannten Angelegenheiten einen Unterbeauftragten einzusetzen, Vergleiche abzuschließen, zu schlichten, Prozeßsachverhalte anzuerkennen, zurückzutreten, zu quittieren, in Empfang zu nehmen, Verzicht zu erklären und die Rechtsgeschäfte nicht bevollmächtigter Personen zu genehmigen.

Geschehen und unterzeichnet am/Dado y firmado hoy August 2, 1996

Ingelheim am Rhein

in/en

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

ppa.

Unterschrift Firma

Reinhold Fleschhut Dr. Dieter Laudien

Managing Director Director of Corporate Patent Department

LEGALIZACION BEGLAUBIGUNG

Es necesaria la legalización con certificado consular sobre la existencia legal de la compañía, que éste ejerce su objeto social y que la persona que otorga el poder está autorizada para ello. A este efecto les solicitamos que muestren al Cónsul las pruebas que acreditan estos hechos.

Es wird eine Beglaubigung und eine Konsularbescheinigung darüber benötigt, daß die Gesellschaft rechtlich besteht, daß sie ihren Gesellschaftszweck erfüllt und daß die Person, die die Vollmacht erteilt, dazu rechtlich befugt ist. Zu diesem Zweck bitten wir Sie höflich, dem Konsul die entsprechenden Nachweise vorlegen zu wollen.



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA: Según los artículos 65 del C. de P.C. y 480 del C. de Co., si el poderdante es una sociedad, el Señor Cónsul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su existencia, que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante.

UR.Nr. 1656 / 96 V

Umseitige, vor mir gefertigte Namensunterschriften von:

1. Herrn ~~Dr.~~ Reinhold F l e s c h h u t, Dipl.-Chemiker, wohnhaft in 55218 Ingelheim, Am Mühlborn 16,

2. Herrn Dr. Dieter L a u d i e n, Dipl.-Chemiker, wohnhaft in 55127 Mainz, Carl-Orff-Straße 11,

- mir vorgestellt durch die Sekretärin Frau Ingrid May, dienstansässig bei der Firma Boehringer Ingelheim GmbH, die sich durch Vorlage ihres Führerscheines ausgewiesen hat -

beglaubige ich hiermit.

Aufgrund meiner heutigen Einsicht in das Handelsregister des Amtsgerichts Bingen bescheinige ich hiermit:

Die Firma Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH mit Sitz in Ingelheim am Rhein wurde am 12. Juni 1978 im Handelsregister unter HR B 1491 eingetragen und die Herren ~~Dr.~~ Reinhold Fleschhut und Dr. Dieter Laudien sind gemeinsam zur Vertretung der Gesellschaft berechtigt.
Weiter bescheinige ich, daß die Gesellschaft ihren Sitz in Ingelheim am Rhein hat.

Gegenstand des Unternehmens ist die Entwicklung, die Herstellung und der Vertrieb von veterinärmedizinischen Präparaten und anderen Produkten zur Gesunderhaltung von Tieren.

Ingelheim am Rhein, den 02. August 1996/hün

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA ANTERIOR ES CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
02 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Notarassessor als amtlich bestellter Vertreter des Notarassessors Dr. Peter Wirth als amtlich bestelltem Notariatsverweser anstelle von Notar Justizrat Prof. Weirich in Ingelheim

- 910 E 1 -

Die Echtheit vorstehender Unterschrift des Notarassessors Dr Scholl als amtlich bestellter Vetreter des Notarassessors Dr. Peter Wirth - Notariatsverweser anstelle des Notars Prof. Dr. Weirich in Ingelheim und die Echtheit des beigedrückten Dienst-stempels-siegels werden hierdurch bestätigt. Zugleich wird bescheinigt, daß der Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung gesetzlich befugt war.

Kostenberechnung:
Gebühr für Legalisation
(Wert: DM 1000,-)
JVKostO. v. 26.7.1957
BGBl. I S. 861
DM 20,-
Mainz, den 9. Aug. 1996

Amtsinspektor

Mainz, den neunten August neunzehnhundertsechsundneunzig
Der Präsident des Landgerichts

(Dr. Hanns Paul Tüttenberg)

CLAVE NOTARIAL SEGÚN DIL DIRECTORIO DE BOGOTÁ D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CORRESPONDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
02 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

8

CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

MUNICH

Nr. 131

El sucrito Cónsul General de Colombia

C E R T I F I C A :

Que el señor(a) **Dr. HAS PAUL TÜTTENBERG,** quién autetica la firma del signatario en el presente documento, ejercía en la fecha allí indicada las funciones de Presidente del Tribunal Regional de Mainz.----------

Que la firma **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH** está registrada en el Registro Mercantil del Juzgado Municipal 653 de Bingen / Rhein, bajo el **número HR B 1491** y que está constituida y ejerce su objeto social de conformidad con las Leyes de la República de Alemania.----------

Que el señor **Dr. DIETER LAUDIN** y el Señor **REINHOLD FLESCHHUT ,** quién(es) firma(n) el presente documento tiene(n) facultad legal y suficiente para representar a la mencionada firma y otorgar poderes en su nombre.----------

Que ha tenido a la vista la documentación que prueba lo anterior. ----------

Munich, a 23 de agosto de 1996

RICARDO MOSQUERA MESA
Cónsul General de Colombia

Derechos para la Nación US $ 6.-
Fondo Rotatorio US $ 100.- PAGADO
Tasa Consular US $ 1,00 = DM 1.60 = DM 169.60

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
02 MAR. 2010
ANTARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA
G.M.B.H.

COD 00484-801-001-5

CONSULADO GENERAL
MUNICH
ALEMANIA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD POR TEXTO

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

205408

CUYA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTO DESLAMPEN
LAS FUNCIONES INDICAD

1996 SET

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

CUYA FIRMA APARECE EN
DOCUMENTO DESLAMPEN
LAS FUNCIONES INDICAD

LEGALIZACIONES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD POR TEXTO

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA

02 MAR. 2010

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

TRADUCCION OFICIAL No. 5446

de un documento escrito en Alemán, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

---

(A continuación de la representación y el poder conferido a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO tpa, 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555; domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia, por la BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH, domiciliada en D-55216 Ingelheim am Rhein, RFA, a través de sus representantes los Srs. Reinhold Fleschhut y Dr. Dieter Laudien:)

LUZ ... TRADUCTORA ... Resolución No. 509 Ministerio ...

Legalización

Protocolo notarial No. 1656/96 V

Certifico la autenticidad de las firmas antecedentes puestas ante mí por los señores:

1. Reinhold F l e s c h h u t, Dipl.Chem. domiciliado en 55218 Ingelheim, Am Mühlborn 16,

2. Dr. Dieter Laudien, Dipl. Chim., domiciliado en 55127 Mainz, Carl-Orff-Straße 11,

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
02 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

10

-presentados por la secretaria señora Ingrid May, con domicilio comercial en la Boehringer Ingelheim GmbH, quien a su vez se identificó con su licencia de conducción-.

Igualmente certifico, por haber examinado en la fecha el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen:

Que la firma Boehringen Vetmedica Ingelheim GmbH, domiciliada en Ingelheim am Rhein, fue inscrita bajo el No. HR B 1491 el 12 de junio de 1978 en el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen y que los señores Reinhold Fleschhut y Dr. Dieter Laudien, están facultados para representar conjuntamente a la sociedad. Además certifico que el domicilio de la sociedad es Ingelheim am Rhein.

El objeto social es el desarrollo, producción y venta de preparados médico-veterinarios y otros productos para la salud animal.

Ingelheim am Rhein, 2 de agosto de 1996/hün

Fdo.: firma ilegible
El notario suplente
del notario de Ingelheim
Prof. Dr. Weirich

(Hilo y oblea roja en relieve:)
El notario suplente - Ingelheim

2

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
02 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

(dos sellos redondos en tinta del Tribunal Regional de Mainz y en hojita adjunta)

910 E 1

Se certifica la autenticidad de la firma antecedente del Dr. Scholl como notari suplente del Dr. Peter Wirth, notario suplente del Prof. Dr. Weirich, notario de Ingelheim, y la del sello oficial que la acompaña. Igualmente se certifica que el mencionado notario estaba facultado para realizar ese acto oficial.

Mainz, nueve de agosto de mil novecientos noventa y seis

El Presidente del Tribunal Regional

(E) Fdo.: firma ilegible

(Dr. Hanns Paul Tüttenberg)

Costas

Derechos de legalización
(Valor:DM 5.000,-)
JVKostO del 26 de julio 1957
Gacetas Oficial I Pag. 861
DM 20,--
Mainz, 13 de diciembre de 1995
Fdo.: firma ilegible
Inspector

COMO NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C., REPÚBLICA DE COLOMBIA
02 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

12

EN ESPAÑOL: La legalización de las firmas antecedentes por el Consulado de Colombia en Munich (Certificación) bajo el No. 131 del 23 de agosto de 1996, y por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia bajo el No. 205408 del 6 de septiembre de 1996.

Pagados derechos y Fondo Rotatorio US$ 106,--

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Santafé de Bogotá, 10 de septiembre de 1996.

LUZ ARMIDA DE ARTEAGA
TRADUCTORA E INTERPRETE
Resolución No. 5[illegible]

COMO NOTARIO SEXTO DE SANTAFE DE BOGOTA
HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE _____
_____
_____
C. C. _____
COINCIDE CON LA REGISTRADA POR EL (ELLOS)
EN ESTA NOTARIA..

16 SET. 1996

SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

República de Colombia
Juan Manuel
Botero Medina
NOTARIO
Notaría Sexta de Bogotá

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C., HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
02 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1996 SET 32

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

208896

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPÚBLICA DE COLOMBIA
02 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
12 February 2009 (12.02.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/020391 A1

(51) International Patent Classification:
G01N 33/569 (2006.01) *A61K 39/09* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/NL2008/050537

(22) International Filing Date: 5 August 2008 (05.08.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
07113844.0 6 August 2007 (06.08.2007) EP

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH** [DE/DE]; Binger Strasse 173, D-55216 Ingelheim Am Rhein (DE).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant *(for US only)*: **SMITH, Hilda Elizabeth** [NL/NL]; Golfpark 98, NL-8241 AG Lelystad (NL).

(74) Agent: **HATZMANN, M.J.**; Vereenigde, Johan de Wittlaan 7, NL-2517 JR Den Haag (NL).

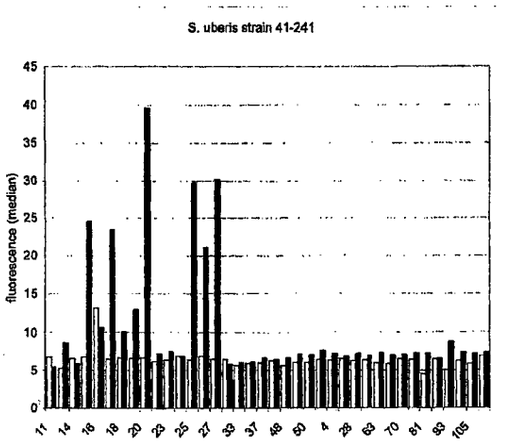
(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

(54) **Title:** IMMUNOGENIC STREPTOCOCCUS PROTEINS

Fig. 1A FACS analysis on intact *S. uberis* strain 41-241



(57) **Abstract:** The invention provides means and methods for identifying a *Streptococcus* protein which is capable of eliciting an immune response against at least two Streptococcus strains and/or serotypes. The invention further discloses immunogenic compositions capable of eliciting an immune response against *Streptococcus* uberis comprising at least two recombinant and/or isolated proteins derived from *Streptococcus* uberis, and/or an immunogenic part or analogue or derivative of either or both of said proteins. The invention further discloses nucleic acid molecules encoding said proteins or immunogenic parts thereof, host cells and recombinant carriers comprising such nucleic acid molecule, and vaccines and diagnostic tests based on said proteins and nucleic acids.

WO 2009/020391 A1

Title: Immunogenic *Streptococcus* proteins

The invention relates to the field of medicine. More specifically, the invention relates to immunogenic *Streptococcus* proteins and immunogenic parts, derivatives and analogues thereof.

The genus *Streptococcus* is comprised of a wide variety of both pathogenic and commensal Gram-positive bacteria which are found to inhabit a wide range of hosts, including humans, horses, pigs and cows. Within the host, streptococci are often found to colonize the mucosal surfaces of the upper respiratory tract. However, in certain circumstances streptococci can also cause diseases that range from subacute to acute or even chronic.
Up to now many commercial vaccines against *Streptococcus* are based on whole cell bacterins. Generally such bacterins do produce significant protection against challenge with homologous serotypes, but do not protect against challenge with heterologous serotypes. Vaccination with whole cell *Streptococcus* often results in an immune response which is directed against the same *Streptococcus* strain, but which is not (sufficiently) directed against other *Streptococcus* strains, let alone other *Streptococcus* serotypes. As a result, many vaccines provide insufficient protection against heterologous strains and/or serotypes because vaccination against one *Streptococcus* strain is generally not efficient in counteracting infection by another *Streptococcus* strain. Moreover, vaccination against one *Streptococcus* serotype is generally not efficient in counteracting infection by another *Streptococcus* serotype. Therefore, immunogenic compositions capable of eliciting an immune response against at least two *Streptococcus* strains, preferably against two *Streptococcus* serotypes, are desired.

It is an object of the present invention to provide *Streptococcus* proteins and immunogenic parts, derivatives and/or analogues thereof, and nucleic acid

molecules coding therefore, that are capable of eliciting an immune response against at least two strains of *Streptococcus*.

The invention provides a method for identifying a *Streptococcus* protein which is capable of eliciting an immune response against at least two *Streptococcus* strains, the method comprising:
a) identifying at least part of a secreted protein, a surface-associated protein and/or a protein with at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor;
b) selecting at least one protein identified in step a) which is conserved over at least two *Streptococcus* strains; and
c) determining whether at least one protein selected in step b) or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof is capable of specifically binding an antibody and/or immune cell of an animal infected by a first *Streptococcus* strain and an antibody and/or immune cell of an animal infected by a second *Streptococcus* strain. Said first *Streptococcus* strain and said second *Streptococcus* strain are preferably of the same *Streptococcus* species. Preferably, said protein with at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor has at least 60%, more preferably at least 70 %, more preferably at least 75%, most preferably at least 80% sequence identity to a bacterial virulence factor.

According to the present invention, at least one *Streptococcus* protein is identified which is capable of eliciting an immune response against at least two *Streptococcus* strains. Said protein is suitable for immunizing an individual and/or non-human animal because it is capable of eliciting a broad immune response. Hence, the present invention obviates the need to provide a vaccine for each and every *Streptococcus* strain and/or serotype. The use of an immunogenic *Streptococcus* protein of the invention therefore saves time and money. More importantly, an immunogenic *Streptococcus* protein of the

invention is in principle capable of eliciting an immune response against a *Streptococcus* strain that is not yet known, or against which no specific vaccine is available yet (for instance a strain which has recently evolved in nature). Preferably, a *Streptococcus* protein of the invention is capable of eliciting an immune response against at least two *Streptococcus* serotypes. A preferred embodiment of the invention therefore provides a method for identifying a *Streptococcus* protein which is capable of eliciting an immune response against at least two *Streptococcus* serotypes, the method comprising:

a) identifying at least part of a secreted protein, a surface-associated protein and/or a protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor;

b) selecting at least one protein identified in step a) which is conserved over at least two *Streptococcus* serotypes; and

c) determining whether at least one protein selected in step b) or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof is capable of specifically binding an antibody and/or immune cell of an animal infected by a first *Streptococcus* serotype and an antibody and/or immune cell of an animal infected by a second *Streptococcus* serotype.

An immune response against at least two *Streptococcus* strains and/or *Streptococcus* serotypes is defined herein as a humoral and/or a cellular immune response directed against *Streptococcus* of at least two different strains and/or serotypes. Said immune response is for instance elicited in a non-human animal. It is also possible to elicit an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus* in a human individual in order to prevent and/or counteract a *Streptococcus* related disease. A humoral immune response leads to the production of antibodies, whereas a cellular immune response predominantly enhances the formation of reactive immune cells such as T killer cells. In general, both parts of the immune response are elicited by administration of an immunogenic protein or immunogenic part

thereof. An immune response against at least two strains/serotypes of *Streptococcus* preferably comprises antibody production. Said immune response is preferably capable of at least in part decreasing the number of *Streptococcus* organisms in a human individual and/or non-human animal. Said immune response is furthermore preferably capable of at least in part counteracting a *Streptococcus* caused disorder.
A *Streptococcus* strain is identifiable by its morphological, biochemical and serological characteristics, as is well known in the art. A *Streptococcus* serotype is a group of *Streptococcus* whose classification is based on the presence of specific antigenic polysaccharides. Classification of *Streptococcus* serotypes is also well known in the art.

A method of the invention comprises identifying at least part of a secreted protein, a surface-associated protein and/or a protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor. Said protein is identified in various ways. In one embodiment of the invention a genomic approach is used. A gene encoding a secreted protein and/or a surface-associated protein is identified, for instance by searching for a motif of said secreted protein and/or surface-associated protein. Said motif preferably comprises a lipid attachment site, a signal peptidase cleavage site and/or a sortase attachment site. Of course, it is possible to search for other motifs known in the art. One embodiment of the invention therefore provides a method of the invention wherein said secreted protein and/or surface-associated protein is identified by identifying in at least part of the genomic sequence of a *Streptococcus* a gene comprising a motif of a secreted and/or surface-associated protein. Additionally, or alternatively, a gene encoding a secreted protein and/or a surface-associated protein is identified by one or more other methods known in the art. For instance, once a gene of a *Streptococcus* species encoding a secreted protein and/or a surface-associated protein is known, it is possible to

screen another *Streptococcus* genomic sequence for the presence of a gene with high % sequence identity.

In one embodiment, such a screening method comprises a method in which said another *Streptococcus* genomic sequence is screened for its capability of hybridizing to a nucleotide sequence encoding a secreted and/or surface-associated protein of *Streptococcus*. The invention therefore provides a method according to the invention, wherein said protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor is identified by identifying in at least part of the genomic sequence of *Streptococcus* a gene which is capable of hybridizing to any of the nucleic acid sequences listed in Figure 4 at 65°C in a buffer having 0.5 M sodium phosphate, 1 mM EDTA, and 7% sodium dodecyl sulphate at a pH of 7.2, wherein the nucleic acid molecule remains hybridized after washing twice with a buffer containing 40 mM sodium phosphate (pH 7.2), 1mM EDTA and 5% sodium dodecyl sulphate for 30 minutes at 65°C and; washing twice with a buffer containing 40 mM sodium phosphate (pH 7.2), 1 mM EDTA and 1% sodium dodecyl sulphate for 30 minutes at 65°C. Preferably, said protein with at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor has at least 60%, more preferably at least 70 %, more preferably at least 75%, most preferably at least 80% sequence identity to a bacterial virulence factor.

The art furthermore provides various methods for determining whether a *Streptococcus* protein has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor. For instance, the amino acid sequence of a *Streptococcus* protein is compared with the amino acid sequence of a bacterial virulence factor. It is also possible to apply a genomic approach. A gene encoding a *Streptococcus* protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor is for instance identified by screening a *Streptococcus* genomic sequence for a nucleotide sequence which has at least 50% sequence identity to a bacterial gene encoding a virulence factor. One embodiment of the invention

therefore provides a method of the invention wherein a protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor is identified by identifying in at least part of the genomic sequence of a *Streptococcus* a gene which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor gene. However, many alternative methods for determining whether a *Streptococcus* protein has at least 50% sequence identityt to a bacterial virulence factor are known in the art.

Once at least one *Streptococcus* gene encoding a secreted protein, a surface-associated protein and/or a protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor is identified, it is preferably determined whether at least one of said genes is conserved over at least two *Streptococcus* strains. A gene of a first *Streptococcus* strain is conserved over at least two *Streptococcus* strains if a genome of a second *Streptococcus* strain comprises a nucleic acid sequence which has at least about 60% sequence identity to said gene of said first *Streptococcus* strain. Preferably, said nucleic acid sequence has at least 70%, more preferably at least 75%, more preferably at least 80% more preferably at least 90%, most preferably at least 95% sequence identity to said gene. The term "sequence identity" refers to the percentage identity between two nucleic acid sequences or amino acid sequences. Two nucleic acid sequences have at least 60% sequence identity to each other when said sequences exhibit at least 60% sequence identity after aligning the two sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Methods and computer programs for the alignment are well known in the art. One computer program which may be used or adapted for purposes of determining whether a candidate sequence falls within this definition is "Align 2", authored by Genentech, Inc., which was filed with user documentation in the United States Copyright Office, Washington, D.C. 20559, on Dec. 10, 1991..

According to one embodiment of the invention, if a gene of the invention is conserved over at least two *Streptococcus* strains, the protein encoded by

said gene is a good candidate for assessing whether said protein, or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof, is capable of eliciting an immune response against more than one *Streptococcus* strain. Said first *Streptococcus* strain and said second *Streptococcus* strain are preferably of the same *Streptococcus* species.

Preferably, it is determined whether said gene is conserved over at least two *Streptococcus* serotypes, in order to identify a good candidate protein (encoded by said gene) which is tested for its capability of eliciting an immune response against more than one *Streptococcus* serotype. A method of the invention which further comprises selecting a gene which is conserved over at least two *Streptococcus* strains and/or serotypes is therefore preferred.
Once a gene conserved over at least two *Streptococcus* strains/serotypes is identified, a protein encoded by said gene is preferably obtained. Additionally, or alternatively, an immunogenic part, derivative and/or analogue of said protein is obtained. The art provides various methods for obtaining a protein encoded by a gene, or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof. Said gene is for instance expressed by a suitable expression system. Non-limiting examples of expression systems comprise eukaryotic host cells such as yeast and prokaryotic host cells such as *Escherichia coli*. Preferably, a gene of the invention encoding a secreted protein, a surface-associated protein and/or a protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor, which gene is conserved over at least two *Streptococcus* strains, is expressed in a prokaryotic expression system. A prokaryotic expression system is preferred because a (prokaryotic) *Streptococcus* protein is in principle better expressed in a prokaryotic expression system. Moreover, a prokaryotic expression system is generally more easily set up and used.

A method of the invention comprises determining whether at least one protein of the invention or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof is

capable of specifically binding an antibody and/or immune cell of an animal infected by a first *Streptococcus* strain and an antibody and/or immune cell of an animal infected by a second *Streptococcus* strain. Preferably, it is determined whether at least one protein of the invention or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof is capable of specifically binding an antibody and/or immune cell of an animal infected by a first *Streptococcus* serotype and an antibody and/or immune cell of an animal infected by a second *Streptococcus* serotype. Many methods are known in the art for performing said test. Preferably, serum of at least two animals infected by at least two different *Streptococcus* strains is used. Alternatively, serum of only one animal is used, said animal being infected with at least two different *Streptococcus* strains. According to one embodiment, one non-human animal is infected by at least a first *Streptococcus* strain and/or serotype, and a second non-human animal is infected by at least a second *Streptococcus* strain and/or serotype. Said *Streptococcus* strains and/or serotypes are for instance administered intravenously to said animal. Subsequently, according to one embodiment, serum from said animals comprising *Streptococcus*-specific antibodies and/or immune cells is collected. Said serum is optionally processed before use. For instance, antibodies and/or immune cells are at least in part concentrated and/or isolated. A protein of the invention and/or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof is preferably isolated and/or recombinantly produced and subsequently incubated with said serum - or with (partly) isolated antibodies and/or immune cells - derived from said animals. It is possible to administer serum, antibodies and/or immune cells derived from a first animal together with serum, antibodies and/or immune cells derived from a second animal. Alternatively, serum, antibodies and/or immune cells derived from a first animal is administrated firstly, after which serum, antibodies and/or immune cells from a second animal is added. In yet another embodiment serum, antibodies and/or immune cells of a first animal is administrated to one separate batch comprising at least one protein and/or

immunogenic part, derivative and/or analogue according to the invention and serum, antibodies and/or immune cells of a second animal is administered to another batch comprising at least one protein and/or immunogenic part, derivative and/or analogue according to the invention. After incubation said serum, antibodies and/or immune cells are washed away and bound antibodies and/or immune cells are visualised, using any method known in the art. Bound antibodies are for instance incubated with a second antibody capable of specifically binding said bound antibodies, which second antibody is conjugated with horse-radish peroxidase. After unbound second antibodies are washed away, hydrogen peroxide is administered. Breakdown of hydrogen peroxide by horse-radish peroxidase is coupled to the oxidation of a chromogenic compound, so that the reaction is made visible.

If a protein of the invention and/or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof appears to be specifically bound by an antibody and/or immune cell elicited by a first *Streptococcus* strain, and by an antibody and/or immune cell elicited by a second *Streptococcus* strain, it indicates that said protein, immunogenic part, derivative and/or analogue is capable of eliciting an immune response against at least two *Streptococcus* strains.

In one preferred embodiment an antibody and/or immune cell derived from a convalescent serum of an animal which was infected with a *Streptococcus* is used. A convalescent serum is derived from an animal which has efficiently counteracted its infection. Hence, a convalescent serum of an animal which was infected with *Streptococcus* comprises antibodies and/or immune cells that are capable of protecting said animal against a challenge with the same *Streptococcus* strain. Therefore, incubation with a convalescent medium is preferred in order to determine whether a protein and/or immunogenic part, derivative and/or analogue according to the invention is capable of eliciting a protective immune response.

One embodiment of the invention thus provides a method for identifying a *Streptococcus* protein which is capable of eliciting an immune response against

at least two *Streptococcus* strains, the method comprising:
- obtaining isolated and/or recombinant *Streptococcus* proteins;
- incubating said proteins with an antibody and/or immune cell of an animal infected by a first *Streptococcus* strain and/or serotype, and with an antibody and/or immune cell of an animal infected by a second *Streptococcus* strain and/or serotype, and
- determining whether a protein is capable of binding an antibody and/or immune cell of an animal infected by a first *Streptococcus* strain and/or serotype and an antibody and/or immune cell of an animal infected by a second *Streptococcus* strain and/or serotype.

Proteins of *Streptococcus* are obtained in various ways. Preferably, secreted proteins, surface-associated proteins and/or proteins which have at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor are isolated from a *Streptococcus* culture. In one embodiment surface-associated proteins are stripped from *Streptococcus* using for instance lysozyme.
In one embodiment *Streptococcus* proteins are recombinantly produced using at least one nucleic acid sequence encoding at least one of said proteins. As explained above, a gene encoding a secreted protein, a surface-associated proteins and/or a protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor is preferably used. More preferably, said gene is conserved over at least two *Streptococcus* strains and/or serotypes.
Alternatively, or additionally, a *Streptococcus* protein or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof is generated using another method known in the art. For instance, an immunogenic *Streptococcus* protein or peptide is generated using a common synthesis technique such as solid phase synthesis. As another example, a *Streptococcus* protein is isolated from a *Streptococcus*, or recombinantly made, after which it is modified in order to produce an immunogenic part, derivative and/or analogue.

In one preferred embodiment *Streptococcus* proteins are separated on a polyacrylamide gel and subsequently incubated with an antibody and/or immune cell of an animal infected by a first *Streptococcus* strain and/or serotype and an antibody and/or immune cell of an animal infected by a second *Streptococcus* strain and/or serotype. Preferably a two-dimensional polyacrylamide gel is used.

In a preferred embodiment a *Streptococcus* protein is identified which is capable of eliciting opsonophagocytosis inducing antibodies. Opsonophagocytosis is a natural process wherein a microorganism is opsonized by opsonins, after which said microorganism is phagocytised by a phagocytic cell and killed. Many microorganisms need to be opsonized by opsonins to enhance their phagocytosis. Opsonization is a process of making a microorganism more susceptible for uptake by a phagocyte. In said process, opsonizing antibodies and/or proteins bind to said microorganism, thereby facilitating the uptake of said microorganism by said phagocyte. Hence, a *Streptococcus* protein of the invention or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof capable of eliciting opsonophagocytosis inducing antibodies is preferred because administration of such protein and/or immunogenic part, derivative and/or analogue to an animal results in the presence of opsonophagocytosis inducing antibodies in said animal capable of phagocytosing *Streptococcus*.

A *Streptococcus* protein of the invention or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof is capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus*. In order to elicit an even broader immune response, it is preferred to identify at least two different *Streptococcus* proteins, and/or an immunogenic part, derivative and/or analogue of at least one of said proteins. More preferably, at least three different *Streptococcus* proteins, and/or an immunogenic part, derivative

and/or analogue of at least one of said proteins is identified, et cetera. The higher the number of *Streptococcus* proteins and/or immunogenic parts, derivatives and/or analogues of the present invention that are identified, the broader immune response is elicited.

In another preferred embodiment at least one *Streptococcus* protein and/or an immunogenic part, derivative and/or analogue according to the invention is identified which is capable of eliciting an immune response against at least three strains of *Streptococcus*. Said protein and/or immunogenic part, derivative and/or analogue is particularly suitable for eliciting a broad immune response in a human individual and/or a non-human animal. More preferably at least one *Streptococcus* protein and/or an immunogenic part, derivative and/or analogue according to the invention is identified which is capable of eliciting an immune response against at least three *Streptococcus* serotypes.

An immunogenic part of a protein is defined as a part of a protein which is capable of eliciting an immune response in a human individual and/or a non-human animal. Preferably said immunogenic part is capable of eliciting the same immune response in kind, albeit not necessarily in amount, as said protein. An immunogenic part of a protein preferably comprises one or more epitopes of said protein. An epitope of a protein is defined as a part of said protein, at least about 5 amino acids in length, capable of eliciting a specific antibody and/or immune cell capable of specifically binding said epitope. Two different kinds of epitopes exist: linear epitopes and conformational epitopes. A linear epitope comprises a stretch of consecutive amino acids. A conformational epitope is formed by several stretches of consecutive amino acids that are folded in position and together form an epitope in a properly folded protein. An immunogenic part of the invention is capable of comprising either one, or both, of said kinds of epitopes.

An immunogenic part of a protein comprises at least 5 amino acid residues. Preferably said immunogenic part comprises at least 10, more preferably at

least 15, more preferably at least 25 and most preferably at least 30 consecutive amino acids. Said immunogenic part preferably comprises at most about 500 amino acid residues, more preferably at most 250 amino acid residues, depending on the kind of protein from which said immunogenic part is derived.

A derivative of a protein is defined as a molecule which has the same immunogenic properties in kind, not necessarily in amount. A person skilled in the art is capable of altering a protein such that the immunogenic properties of said molecule are essentially the same in kind, not necessarily in amount, as compared to said protein. A derivative of a protein is for instance provided by mutating at least one amino acid residue of said protein and/or by replacing one amino acid residue by another amino acid residue. Preferably, conservative amino acid substitutions are made, like for example replacement of an amino acid comprising an acidic side chain by another amino acid comprising an acidic side chain, replacement of a bulky amino acid by another bulky amino acid, replacement of an amino acid comprising a basic side chain by another amino acid comprising a basic side chain, et cetera.

A person skilled in the art is well able to generate analogous compounds of a protein. This is for instance done through screening of a peptide library or by peptide changing programs. An analogue according to the invention has essentially the same immunogenic properties of said protein in kind, not necessarily in amount. An analogue of a protein of the invention for instance comprises a fusion protein and/or chimaeric protein.

In order to be capable of eliciting an immune response, an immunogenic part, derivative and/or analogue according to the invention is preferably provided with the proper characteristics to enable antibody and/or immune cell production. Said characteristics, which are well known in the art, for instance include suitable flanking sequences and/or proteolytic cleavage sites.

Alternatively, or additionally, a protein, immunogenic part, derivative and/or

analogue according to the invention is preferably provided with an immunogenic carrier.

Once a protein or an immunogenic part, derivative and/or analogue according to the invention is administered to a human individual or non-human animal, it is usually at risk of degradation caused by a number of different forces, such as for example proteolysis, unfolding, extreme pH values, detergents and high salt concentrations. To prolong the life of a protein or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof, its resistance to degradation is preferably enhanced, for example by synthesizing a peptide with a C-terminal carboxamide and/or acetylating the N-terminal end of a peptide in order to maintain the native charge characteristics. In one embodiment resistance to degradation is further enhanced by mutating a protein or an immunogenic part, derivative and/or analogue according to the invention such that a local unfolding process rendering said protein or immunogenic part, derivative and/or analogue thereof susceptible to autolysis is at least in part inhibited. Stabilizing mutation strategies are known and for instance described by Matthews (1991), Alber (1991), Vriend and Eijsink (1993) and Fersht and Serrano (1993).

A secreted protein is defined as a protein which is naturally produced in a cell and/or organism and at least in part secreted from said cell and/or organism into its environment. Hence, if *Streptococcus* is cultured, a secreted protein is at least in part present in at least part of the culture medium, at least at some time point. A secreted protein needs not be produced and/or secreted continuously. A secreted protein may for instance only be produced and/or secreted during a certain phase of a bacterial life cycle. Furthermore, production and secretion of a secreted protein need not occur at the same time. For instance, some secreted proteins firstly accumulate inside a cell and are secreted at a later time point.

A surface-associated protein is defined as a protein which naturally forms part of a surface of a cell, or which is attached to a surface of a cell. If said surface-associated cell is attached to a surface of a cell, it is either directly or indirectly attached. Indirect attachment for instance involves the presence of at least one linker.

The term "isolated protein" refers to a protein which is at least in part isolated from its natural environment, and/or to a protein which is devoid of at least part of a sequence normally associated with it in nature.

The term "recombinant protein" refers to a protein which is produced by an isolated and/or artificial expression system, preferably using a nucleic acid sequence encoding said protein. Said nucleic acid sequence is preferably operably linked to at least one regulatory sequence such as for instance a promoter, an enhancer and/or a terminater. Preferably said regulatory sequence is inducible, so that it is possible to control the extent of expression of said protein. In one embodiment said nucleic acid sequence comprises an exogenous nucleic acid sequence. An exogenous nucleic acid sequence is a nucleic acid sequence which is present at a site in an organism's genome where said nucleic acid sequence is not naturally present.

After a *Streptococcus* protein capable of eliciting an immune response against at least two *Streptococcus* strains and/or serotypes is identified by a method of the invention, it is preferably produced. Produced protein is for instance suitable for generating an immunogenic composition and/or eliciting an immune response against at least two *Streptococcus* strains and/or serotypes in an animal. As outlined above, various methods for producing a protein are known in the art, such as for instance recombinant production. The invention therefore provides a method for producing at least one protein identified by a method of the invention. A *Streptococcus* protein which is capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of

Streptococcus obtainable by a method of the invention is also herewith provided.

A *Streptococcus* protein and/or immunogenic part, derivative and/or analogue according to the invention is particularly suitable for preparing an immunogenic composition. Said immunogenic composition is capable of eliciting a broad humoral and/or cellular immune response against at least two *Streptococcus* strains. Preferably a *Streptococcus* protein and/or immunogenic part, derivative and/or analogue capable of eliciting an immune response against at least two *Streptococcus* serotypes is used for preparing an immunogenic composition, so that a broad immune response against at least two *Streptococcus* serotypes is achieved. A use of a protein obtainable by a method of the invention, or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof, for the preparation of an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against at least two *Streptococcus* strains and/or serotypes is therefore also provided, as well as an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against at least two *Streptococcus* strains and/or serotypes comprising at least one isolated and/or recombinant protein obtainable by a method of the invention, or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof. In order to provide an even broader protection, at least two or more proteins and/or immunogenic parts, derivatives and/or analogues of the invention are preferably used for the preparation of an immunogenic composition. In one embodiment a combination of at least one protein and at least one immunogenic part, derivative and/or analogue according to the invention is used for the preparation of an immunogenic composition.

Besides a broader protection, the use of at least two proteins and/or immunogenic parts, derivatives and/or analogues of the invention decreases the chance of development of escape mutants of *Streptococcus* organisms. Escape mutants of bacterial organisms generally develop under environmental

stress, for example in the presence of an antibiotic and/or in the presence of antibodies against an epitope of said organism. By natural variation in the population of an organism some organisms escape from the inhibitory effect of said environmental stress, such as the presence of said antibiotic and/or antibodies, and are capable of multiplying. The chance of development of an escape mutant for several different epitopes at one time is smaller than the chance of development of an escape mutant for only one epitope.

Hence, an immunogenic composition of the invention preferably comprises at least two isolated and/or recombinant proteins, and/or at least one immunogenic part, derivative and/or analogue thereof, obtainable by a method of the invention. In order to even better avoid the formation of escape mutants a protein of the invention preferably comprises an essential protein. This is a protein that is important - preferably essential - for the metabolism, survival and/or multiplication of *Streptococcus*. Hence, a possible escape mutant with an altered essential protein is less - if at all - viable.

Tables 5 and 6 comprise a list of preferred *Streptococcus* uberis proteins that are identified by a method of the invention. These proteins, or at least one immunogenic part, derivative and/or analogue thereof, are suitable for the preparation of an immunogenic composition of the invention. A use of the invention wherein said protein is selected from Table 5 and/or Table 6 is therefore also provided, as well as an immunogenic composition of the invention comprising at least one isolated and/or recombinant protein as depicted in Table 5 and/or 6, or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof. In order to provide an even broader protection, said immunogenic composition preferably comprises at least two proteins as depicted in Table 5 and/or Table 6, and/or immunogenic parts, derivatives and/or analogues thereof. Most preferably, said immunogenic composition comprises at least three proteins as depicted in Table 5 and/or Table 6, and/or immunogenic parts, derivatives and/or analogues thereof.

In a preferred embodiment, the at least one, at least two or at least three proteins as depicted in Table 5 and/or Table 6 are taken from the group consisting of P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, P105, surface exclusion protein, trigger factor (ropA), and nucleoside diphosphate kinase. These proteins are either recognized by antibodies present in sera of *S. uberis* infected animals, indicating that these proteins are expressed in vivo and are immunogenic in cows, or are cross-reactive between at least two strains of *S. uberis* as depicted in Table 5. The numbering of proteins above, characterized for instance in Table 5, refers to the proteins depicted in for instance Tables 1, 2 and 3 which show non-limiting examples of *S. uberis* common surface proteins . Further, Figure 4 shows non-limiting examples of nucleic acid and amino acid sequences of these selected putative surface proteins/virulence factors of *S. uberis*.

Proteins that are highly conserved, expressed in vivo and highly immunogenic, such as proteins that are recognized by convalescent sera from cows infected with different strains as shown in Example 11, are especially useful in an immunogenic composition according to the invention. In an even more preferred embodiment therefore, the selection of proteins from Table 5 and/or 6 comprises a protein selected from the group consisting of P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, and P105. Most preferably, the selection of proteins from Table 5 and/or Table 6 comprises a protein selected from the group consisting of P15, P16, P54, P28, P63, and P105. As shown in Example 11, the latter selection was recognized by all convalescent sera used, indicating that these antigens are expressed by all S. uberis strains that cause the respective infection, that these antigens are expressed during infection in the host and that these antigens are highly immunogenic.

Yet another embodiment provides an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus* comprising at least one nucleic acid molecule encoding at least

one protein obtainable by a method of the invention, or an immunogenic part, derivative and/or analogue of said protein. Upon administration of said immunogenic composition to an animal, said nucleic acid molecule is expressed by the animal's machinery, resulting in expression of at least one protein and/or immunogenic part, derivative and/or analogue according to the invention. The production and, optionally, extracellular excretion of said protein and/or immunogenic part, derivative and/or analogue results in an immune response.

In one embodiment a protein of the invention and/or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof is produced recombinantly. The invention provides a method for producing an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus,* said method comprising providing a cell or another expression system with at least one recombinant vector, said at least one vector comprising a nucleic acid sequence encoding at least one protein obtainable by a method of the invention and/or at least one protein selected from Table 5 and/or 6, and/or an immunogenic part, derivative and/or analogue of said protein. Suitable expression systems are known in the art. In one embodiment at least one nucleic acid sequence encoding one protein of the invention or an immunogenic part thereof is expressed. In another embodiment at least one nucleic acid molecule encoding at least two proteins and/or immunogenic parts is used. It is also possible to use at least two nucleic acid molecules, each nucleic acid molecule encoding one or more proteins and/or immunogenic parts according to the invention, et cetera. For instance, one nucleic acid molecule encoding (at least) one protein and one nucleic acid molecule encoding (at least) one immunogenic part are suitable. Hence, variations of the number of nucleic acid molecules and the number of proteins and/or immunogenic parts encoded by said nucleic acid molecules are possible.

A nucleic acid sequence of the invention is for example inserted into the genome of a cell by homologous recombination. It is also possible to insert a nucleic acid sequence at random, for instance by electroporation. Alternatively, or additionally, said nucleic acid sequence is placed into a vector such as for instance a plasmid vector or a phage vector, which vector is stable in a selected expression system such as a microorganism and/or a cell. Said nucleic acid sequence of the invention is preferably transcribed and translated under the control of a regulatory sequence such as for instance a promoter, enhancer and/or terminator. Preferably said promoter, enhancer and/or terminator is suitable for use in the selected expression system. More preferably, said regulatory sequence is inducible in order to allow for controlled expression. Promoters and terminators suitable for various micro-organisms are disclosed in (Biseibutsugaku Kisokoza (Basic Microbiology), Vol. 8, Genetic Technology, Kyoritsu Shuppan (1990)). For example, suitable plasmid vectors for *Escherichia*, more specifically for *Escherichia coli* are the plasmids of the pBR and pUC series, and suitable promoters for instance comprise *lac* promoter (ß-galactosidase), *trp* operon (tryptofaan operon), and *tac* promoter (*lac-trp* hybride promoter) and promoters derived from λ-faag PL or PR. Preferred terminators comprise *trp*A- or phage derived *rrn*B ribosomal terminator. Plasmid vectors suitable for recombinant production in *Streptococcus* comprise for example pHV1301 (FEMS Microbiol. Lett. 26, 239 (1985)) and pGK1 (Appl. Environ. Microbiol. 50, 94 (1985)).

The invention thus provides a recombinant nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence encoding at least two *Streptococcus* proteins obtainable by a method of the invention and/or selected from Table 5 and/or 6, and/or an immunogenic part of at least one of said proteins, under the control of a functionally linked regulatory sequence such as for instance a promoter. An isolated host cell comprising a nucleic acid sequence encoding at least two proteins obtainable by a method of the invention and/or selected from Table 5

and/or 6, and/or an immunogenic part thereof, is also herewith provided. Said host cell preferably comprises a prokaryotic host cell.

In a preferred embodiment a nucleic acid molecule of the invention is used for eliciting an immune response against *Streptococcus*. This is preferably performed with a recombinant carrier comprising a nucleic acid encoding at least one protein obtainable by a method of the invention and/or selected from Table 5 and/or 6 and/or an immunogenic part of said at least one protein, or a recombinant nucleic acid molecule of the invention. Said recombinant carrier is therefore also herewith provided. Most preferably a recombinant carrier comprising a nucleic acid encoding at least one protein selected from Table 5 and/or 6 is provided. In one particularly preferred embodiment said recombinant carrier comprises a nucleic acid encoding at least two proteins selected from Table 5 and/or 6. In one embodiment, said recombinant carrier is allowed to produce at least one protein of the invention, after which a combination of the at least one recombinant protein and the carrier itself is used for eliciting an immune response against at least two *Streptococcus* strains and/or serotypes. In one embodiment a killed recombinant carrier of the invention is provided. One preferred embodiment however provides a live recombinant carrier of the invention. In one embodiment said live carrier is an attenuated carrier. A live carrier of the invention is preferably capable of infecting a human individual and/or a non-human animal, after which an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus* is elicited.

A recombinant carrier of the invention preferably comprises a *Streptococcus* species. This way an immune response directed against *Streptococcus* is both elicited by the protein(s) and/or immunogenic part(s), derivative(s) and/or analogue(s) encoded by said carrier, and by said recombinant carrier itself. Capsular gene expression products of *Streptococcus* are often highly immunogenic and serotype-specific. Hence, the presence of capsular gene

expression products hampers the induction of an immune response directed against various different strains and/or serotypes of *Streptococcus*. In one embodiment, therefore, if a recombinant carrier of the invention comprises a *Streptococcus*, said *Streptococcus* is lacking at least part of a capsular gene expression product. In one embodiment said *Streptococcus* is a non-capsular streptococcus.

As described above, immunization with at least two proteins and/or immunogenic parts, derivatives and/or analogues derived from at least two different *Streptococcus* strains and/or serotypes provides a broad protection and diminishes the chance of the formation of escape mutants. A preferred embodiment of the invention therefore provides a recombinant carrier of the invention comprising a nucleic acid sequence encoding at least one protein and/or immunogenic part thereof derived from a first *Streptococcus* strain and/or serotype, and a nucleic acid sequence encoding at least one protein and/or immunogenic part thereof derived from a second *Streptococcus* strain and/or serotype. Said recombinant carrier preferably comprises a live recombinant carrier.

A recombinant carrier is for instance produced in a suitable host cell. An isolated host cell comprising a recombinant carrier of the invention is therefore also provided.

A recombinant carrier of the invention is suitable for the production of an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus*. An immunogenic composition capable of eliciting an immune response against *Streptococcus*, said composition comprising a recombinant carrier of the invention is therefore also provided herein.

After administration of an immunogenic composition of the invention to a human individual and/or a non-human animal, an immune response against *Streptococcus* is elicited. Said immune response is preferably capable of at least in part counteracting a *Streptococcus* related disease. An immunogenic composition of the invention for use as a medicament is therefore also herewith provided, as well as a use of an immunogenic composition of the invention for the preparation of a medicament against a *Streptococcus* related disease.

An immunogenic composition of the invention is also suitable for the production of a vaccine. Said vaccine is preferably capable of at least in part providing protection against a *Streptococcus* related disease. Preferably, said vaccine is capable of providing protection against a *Streptococcus* infection. The invention therefore provides a use of an immunogenic composition of the invention for the preparation of a vaccine.

A protein, immunogenic part, derivative, analogue and/or recombinant carrier of the invention is preferably administered to a human individual and/or non-human animal together with a suitable carrier. Said carrier preferably facilitates the acceptance by said human individual and/or animal of said protein, immunogenic part, derivative, analogue and/or recombinant carrier of the invention and preferably increases the immunogenic effect. A suitable carrier of the invention for instance comprises a suitable adjuvant capable of increasing an immunising effect of an immunogenic composition of the invention. Many suitable adjuvants, oil-based and water-based, are known to a person skilled in the art. In one embodiment said adjuvant comprises Diluvac Forte and/or Specol. In another embodiment, said suitable carrier comprises a solution like for example saline, for instance for diluting proteins or immunogenic parts, derivatives and/or analogues thereof. Therefore, the present invention also discloses an immunogenic composition of the invention

comprising at least one protein, immunogenic part, derivative, analogue and/or recombinant carrier of the invention and a suitable carrier.

An immunogenic composition of the invention is capable of eliciting an immune response against *Streptococcus* in a human individual and/or non-human animal and thereby decreasing and/or controlling the number of *Streptococcus* organisms in said individual and/or animal. The invention therefore provides a method for decreasing and/or controlling the number of *Streptococcus* organisms in a human individual and/or non-human animal comprising providing said individual and/or non-human animal with an immunogenic composition of the invention.

An immunogenic composition of the invention is preferably capable of at least in part counteracting and/or preventing a *Streptococcus* related disease. Once a *Streptococcus* related disease is already present, an immunogenic composition of the invention is preferably capable of at least in part counteracting said disease. A pharmaceutical composition comprising an immunogenic composition of the invention and, preferably, a suitable carrier such as for instance Diluvac Forte and/or Specol is therefore also herewith provided.

A further embodiment of the invention provides a method for measuring the immunity of a human individual and/or non-human animal against *Streptococcus,* said method comprising determining in at least one sample from said individual and/or animal the presence of antibodies and/or immune cells directed against a protein obtainable by a method of the invention and/or selected from Table 5 and/or 6, or an immunogenic part thereof. A diagnostic kit comprising at least one protein obtainable by a method of the invention and/or selected from Table 5 and/or 6, or an immunogenic part thereof, and a means for detecting antibody binding and/or immune cell binding to said protein or immunogenic part thereof is also herewith provided. In a

particularly preferred embodiment said diagnostic kit comprises at least two proteins selected from Table 5 and/or 6.

Detailed description

A method according to the invention is in a preferred embodiment applied for identifying a *Streptococcus uberis* protein which is capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or seroypes of *Streptococcus uberis*. Such *Streptococcus uberis* protein is preferably used for the preparation of an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus uberis*. An immunogenic composition capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus uberis* comprising at least one, preferably at least two, isolated and/or recombinant protein(s) obtainable by a method according to the present invention, or at least one immunogenic part, derivative and/or analogue thereof, is therefore also herewith provided, as well as uses thereof for the preparation of a medicament against *Streptococcus uberis* mastitis. The invention furthermore provides an isolated or recombinant nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence encoding at least two *Streptococcus uberis* proteins obtainable by a method according to the present invention, and/or selected from Table 5 and/or 6. Further provided are recombinant carriers, host cells and immunogenic compositions comprising said nucleic acid, as well as uses thereof.

Streptococcus uberis is associated with bovine mastitis. Bovine mastitis is an infection of the mammary gland of a cow, usually caused by bacteria. The inflammatory response following infection results in decreased yield and quality of the milk, and causes major annual economic losses to the dairy

industry. The economic damage in the Netherlands is estimated to be around 100 Euro per cow per year.

Among the bacterial species most commonly associated with mastitis are various species of the genus *Streptococcus*, including *Streptococcus uberis* (untypeable), *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B), *Streptococcus dysgalactiae* (Lancefield group C), *Streptococcus zooepidemicus*, and the Lancefield groups D, G, L and N streptococci. Some of those species are contagious (e.g. *S. agalactiae*), while others are considered environmental pathogens (e.g. *S. dysgalactiae* and *S.uberis*).

Mastitis resulting from infection with *S.uberis* is commonly sub-clinical, characterized by apparently normal milk with an increase in somatic cell counts due to the influx of leukocytes.

Mastitis varies in severity according to the clinical effects caused by the infection. A mild form of mastitis may cause some rise in body temperature, and/or increase in temperature of the udder. In more severe cases, *S.uberis* mastitis may also take the form of an acute clinical condition, with obvious signs of disease such as clots or discoloration of the milk and swelling or hardness of the mammary gland. Some cases of the clinical disease can be severe and pyrexia may be present. For a review of the clinical manifestations of *S.uberis* mastitis, see Bramley (1991); and Schalm et al. (1971).

Conventional antibacterial control methods such as teat dipping and antibiotic therapy are effective in the control of many types of contagious mastitis, but the environmental organisms typically found in all dairy barns are often resistant to such measures. These measures have therefore not influenced the incidence of mastitis caused by environmental pathogens such as *Streptococcus uberis* and *Escherichia coli* that are now responsible for over 95% of cases of mastitis. From these two species, *S.uberis* is the most important environmental pathogen, as shown by surveys executed in the United Kingdom (Hillerton et al., 1993), in New Zealand (McDougall, 1998), in the US

(Hogan et al., 1989), and in the Netherlands (Animal Health Service, 2000). There is also evidence that *S.uberis*, once infection is established from the environment, can directly spread from an infected cow to a susceptible animal (Neave et al., 1969, Oliver et al., 1999, Zadoks et al., 2001). There are several strains of *S.uberis* that differ in virulence and antigenicity.

The failure of current methods aiming at *S.uberis* mastitis control has led to the search for alternative control measures such as more effective vaccines. Several types of vaccines have been developed up to now and have been tested in cows.

Repeated immunization of dairy cattle with killed whole bacteria resulted in reduction of the number of bacteria present in the milk following experimental challenge with the same strain (Leigh, 1999; Leigh, 2000). The killed vaccine did however not prevent the infection nor the inflammatory response in the mammary gland, and had no effect on the incidence of *S.uberis* mastitis in the field (Leigh, 1999). Therefore, it was concluded that immunization with killed bacteria was not a solution to the problem of *S.uberis* mastitis.

Immunization with live *S.uberis* induced partial protection against experimental challenge with the same (or homologous) strain (Finch et al., 1997). Protection was achieved in the absence of opsonising activity and without a large influx of neutrophils. However, the vaccine did not seem to protect against other *S.uberis* strains. The relative low success with these whole cell vaccine approaches indicates that it is difficult to protect an animal against S.uberis using conventional whole bacteria vaccines.

More recently, a subunit vaccine was produced, based on one protein of *S.uberis*. (Fontaine *et al.* 2002). The publication of said subunit vaccine has up to now not led to a follow up, which has led to the conclusion that the chances on finding a single protein that will protect an animal against several types of *S.uberis* are small and subunit vaccines of this kind generally are not the answer to the problem of controlling *S.uberis* mastitis.

In summary, mastitis caused by *S.uberis* is not effectively prevented or cured by vaccination with either whole, life or killed bacteria or with a subunit vaccine comprising one protein.

Despite the above-described discouraging results of vaccination against *S.uberis* mastitis, we here disclose that mastitis caused by a variety of *S.uberis* strains is successfully prevented and/or diminished by using an antigenic composition capable of eliciting an immune response against *S.uberis* according to the invention.

The present invention provides a method for identifying a *Streptococcus uberis* protein which is capable of eliciting an immune response against at least two *Streptococcus uberis* strains and/or types, the method comprising:
a) identifying at least part of a secreted protein, a surface-associated protein and/or a protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor;
b) selecting at least one protein identified in step a) which is conserved over at least two *Streptococcus uberis* strains and/or types; and
c) determining whether at least one protein selected in step b) or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof is capable of specifically binding an antibody and/or immune cell of an animal infected by a first *Streptococcus uberis* strain and/or type, and an antibody and/or immune cell of an animal infected by a second *Streptococcus uberis* strain and/or type.
Preferably, said protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor has at least 60%, more preferably at least 70 %, more preferably at least 75%, most preferably at least 80% sequence identity to a bacterial virulence factor.

The present invention furthermore discloses that a combination of at least two isolated or recombinant *S.uberis* surface proteins or an immunogenic part thereof in an antigenic composition enhances the immune response against

S.uberis strains considerably. Whereas whole bacterial cell vaccines, comprising many bacterial immunogenic proteins do not elicit a broad protection against various *S.uberis* strains, two or more proteins or an immunogenic part thereof in an immunogenic composition of the invention have the desired effect of enhancing the immune response against *S.uberis*. We disclose in the present invention that selecting at least two immunogenic proteins or an immunogenic part thereof of a *S.uberis* organism, and preferably of at least two strains or types of *S.uberis* organisms and combining said at least two immunogenic proteins or an immunogenic part thereof in a immunogenic composition enhances the immunity against different strains of *S.uberis* because the immune response is directed against a broader range of different *S.uberis* organisms.

For eliciting an immune response in a subject or an animal, preferably an immunogenic part of a protein is presented to said subject or animal. In this invention, the term "immunogenic site" is used interchangeably with the term "immunogenic part". By "immunogenic part or site" is meant a part of a protein, which is capable of eliciting an immunological response in a subject. Preferably said immunogenic part of a protein comprises one or more epitopes and thus elicits an immunological response. An immunogenic part comprises at least 5 amino acids, preferably at least 10-15, and most preferably 25 or more consecutive amino acids. Therefore, the invention in another embodiment provides a protein or an immunogenic part thereof comprising at least a stretch of 30 consecutive amino acids of a proteinaceous molecule encoded by a nucleic acid according to the invention. A conformational epitope is generally formed by several stretches of consecutive amino acids that are folded in position and together form an epitope when the protein takes on its three dimensional structure. The present invention also discloses the use of conformational epitopes as immunogenic parts.

A derivative of a protein is defined as a protein, which has the same kind of immunogenic properties in kind, not necessarily in amount. A person skilled in

the art is capable of altering a protein such that the immunogenic properties of said molecule are essentially the same in kind, not necessarily in amount. A derivative of a protein can be provided in many ways, for instance through conservative amino acid substitution, for example by replacement of one amino acid in a protein by another amino acid. In conventional replacement mapping, preferably conservative changes are made, like for example replacement of an amino acid comprising an acidic side chain by another amino acid comprising an acidic side chain, bulky amino acids by bulky amino acids, amino acids comprising a basic side chain by amino acids comprising a basic side chain, amino acids comprising an uncharged polar side chain by amino acids comprising an uncharged polar side chain, and amino acids comprising an nonpolar side chain by amino acids comprising an nonpolar side chain. A person skilled in the art is well able to generate analogous compounds of a protein. This is for instance done through screening of a peptide library or by peptide changing programs. For use as an immunogen, a peptide is synthesized with the proper characteristics to insure high probability of success in antibody production. These include a C-terminal free carboxyl group if the peptide is the actual C-terminal sequence of the native protein and a free N-terminal amino group if the peptide is the actual N-terminal sequence of the native protein. Such an analogue has essentially the same immunogenic properties of said protein in kind, not necessarily in amount.

A protein or peptide is subject to degradation by a number of different forces, such as for example proteolysis, unfolding, extreme pH values, detergents and high salt concentrations. To prolongue the life of a recombinant protein or peptide, said protein or peptide is made more stable to withstand degradation, for example by synthesizing said peptide with a C-terminal carboxamide and/or acetylating the N-terminal end in order to maintain the native charge characteristics. This is further done by mutations using a stabilizing mutation strategy to inhibit the local unfolding processes that generally render the protein susceptible to autolysis. Said stabilizing mutation strategy is based on

generally accepted principles of protein structure and stability as described by for example Matthews (1991), Alber (1989), Vriend and Eijsink (1993) and Fersht and Serrano (1993).

In one embodiment an immunogenic composition of the invention comprises a composition comprising at least two recombinant or isolated surface proteins or a derivative or an analogue, and/or immunogenic parts thereof, wherein administration of the composition to a subject or an animal, preferably a cow, results in the development of a humoral and/or a cellular immune response to said surface proteins or immunogenic parts thereof.

An immunological response comprises the development of a humoral and/or a cellular immune response directed against said protein or immunogenic part thereof in a subject or an animal, preferably a cow. A humoral immune response leads to the production of antibodies in a subject or an animal, whereas the cellular immune response predominantly enhances the formation of reactive immune cells. In general, both parts of the immune response are elicited by administration of an immunogenic protein or part thereof. A preferred immune response against *S.uberis* is antibody production. Preferably, said immune response prevents and/or decreases mastitis, and/or decreases the number of *S.uberis* organisms in the udder. The present invention discloses methods to select and produce proteins and epitopes for eliciting said antibody response. Another preferred immune response against *S.uberis* is the cellular immune response. The present invention also discloses methods to select T-cell epitopes of surface proteins, and to produce T-cell epitopes causing an enhanced T-cell reactivity, for example by coupling multiple pre-selected T-cell epitopes in a string-of bead fashion as for example described by Van der Burg et al (WO 97/41440).

In one embodiment of the invention, said immunogenic composition is capable of decreasing the duration and/or severity of the infection and/or increasing the resistance of the animal to *S.uberis* infection.

The present invention discloses that an immune response directed against the outside of *S.uberis* is preferred. Therefore, the present invention discloses an immunogenic composition or an immunogenic part thereof that is capable of eliciting an immune response to antigens that are preferably located in or near the cell surface of *S.uberis*. A surface protein of the invention comprises proteins that are in nature preferably near or on the surface of a *S.uberis* bacterium, and/or proteins that are in nature preferably produced and/or excreted extracellular by an *S.uberis* bacterium. Said surface proteins preferably have homologous proteins in other strains of *S.uberis*. Therefore, the immune response elicited with immunogenic proteins or parts thereof, derived from one strain of *S.uberis*, is also effective against other strains of *S.uberis*. Thus the present invention discloses an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against *S.uberis*, said composition comprising at least two recombinant and/or isolated surface proteins derived from *Streptococcus uberis*, and/or an immunogenic part of either or both of said proteins.

The term: "recombinant protein" refers to a protein produced by recombinant DNA techniques; i.e., produced by a cell transformed by a nucleic acid construct encoding the desired protein. Said nucleic acid construct is for example a recombinant DNA construct with a regulatory sequence such as a promoter and/or a terminator sequence, and/or an enhancer sequence, which controls the expression sequence.

The term: "isolated protein" refers to a protein separate and discrete from the whole organism, with which the molecule is found in nature; and/or a protein devoid, in whole or in part, of substances normally associated with it in nature.

Said immunogenic composition comprises either at least two proteins or an immunogenic part thereof derived from the same *S.uberis* organism or it comprises at least one protein or an immunogenic part thereof from one type of *S.uberis* and at least one protein or an immunogenic part thereof from another type of *S.uberis*. The invention also discloses the combination of at least 3 or 4

or more proteins or an immunogenic part thereof, of which one or two or more are derived from other types of *S.uberis*.

Preferably, the immunogenic composition or an immunogenic part thereof of the invention comprises proteins of at least two different *S.uberis* organisms, because the resulting broad immune response is cross-protecting i.e. is directed against different types of *S.uberis*. Furthermore, the use of immunogenic proteins or an immunogenic part thereof of at least two types of *S.uberis* strains decreases the chances of development of escape mutants of *S.uberis* organisms. Escape mutants of bacterial organisms generally develop under environmental stress, for example in the presence of an antibiotic or in the presence of antibodies against an epitope of said organism. By natural variation such as for example caused by a low mutation frequency in the population of an organism, some organisms of said population are more inhibited in their replication by said antibodies, than others, which escape from the inhibitory effect of the presence of said antibodies and keep multiplicating, thereby obtaining a predominant role in the new population. The chance of development of an escape mutant for several different epitopes at one time is smaller than the chance of development of an escape mutant for only one epitope. An immunogenic composition and/or an immunogenic part thereof preferably elicits an immune response against at least two proteins preferably causing a broad protection against infection and decrease of clinical signs of mastitis. Therefore, the present application provides an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against *Streptococcus uberis* comprising at least two recombinant and/or isolated surface proteins derived from at least one *Streptococcus uberis* strain, and/or an immunogenic part or analogue or derivative of either or both of said proteins.

Proteins that are important for the metabolism or survival or multiplication of a bacterial organism are generally known as essential proteins of an organism. The sequence and function of said essential proteins is generally rather conserved between different types of *S.uberis*. In a preferred embodiment of

the invention, said immunogenic proteins are essential proteins of an *S.uberis*. In this way, the immune response is directed against an essential protein or an immunogenic part thereof, thus forming an defence against an homologous *S.uberis* organism, but also a cross-reactive defence against different types of *S.uberis*, because said conserved protein or essential protein is also present on the surface of other types of *S.uberis*. Therefore, the use of an essential surface protein of an *S.uberis* organism as an immunogenic protein of the invention increases the protective efficacy of the immune response against infection with different types of *S.uberis* organisms and decreases the possibility of said organisms to escape the immune response.

Capsular antigens of *S.uberis* are generally good immunogenic epitopes, because capsular antigens are readily detected by convalescent sera of cows, (which have endured an *S.uberis* mastitis). Said immunogenic properties are capable of enhancing the immune response against related *S.uberis* immunogenic epitopes. Therefore, in another embodiment, the immunogenic composition comprises at least one capsular antigen in addition to the immunogenic proteins, because said capsular antigen increases the immune response against said immunogenic composition.

The present patent application discloses in Table 5 and Table 6 preferred recombinant and or isolated surface proteins derived from *S.uberis* and selected for their capability of eliciting an immune response against different strains of *S.uberis*. Therefore, the present application provides an immunogenic composition of the invention, and/or an immunogenic part or analogue or derivative of either or both of said proteins wherein at least two proteins are selected from Table 5 and/or Table 6.

In a preferred embodiment of the invention, a selection is made from the proteins of Table 5 and/or Table 6 and a combination is made of two or more proteins like for example protein no 63 and/or an immunogenic part thereof from *S.uberis* strain O140J, together with protein no 15 or 22 and/or both and/or an immunogenic part thereof from *S.uberis* strain 41-241. Such a

selection provides proteins or immunogenic parts thereof from two different strains of *S.uberis,* thereby providing broad protection for several strains of *S.uberis.*

In a preferred embodiment the selection of proteins from Table 5 and/or Table 6 comprises a protein selected from the group consisting of P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, and P105. As said before,these proteins are either recognized by antibodies present in sera of *S. uberis* infected animals, indicating that these proteins are expressed in vivo and are immunogenic in cows, or are cross-reactive between at least two strains of *S. uberis* as depicted in Table 5.

The proteins as identified in Example 11, are especially useful for eliciting an immune response. In an even more preferred embodiment therefore, the selection of proteins from Table 5 and/or 6 comprise a protein selected from the group consisting of P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, and P105. Most preferably, the selection of proteins from Table 5 and/or Table 6 comprises a protein selected from the group consisting of P15, P16, P54, P28, P63, and P105. As said before, the latter selection of proteins is expressed by all *S. uberis* strains that cause the respective infection of Example 11, are expressed during infection in the host and are highly immunogenic. The numbering of proteins above, characterized for instance in Table 5, refers to the proteins depicted in for instance Tables 1, 2 and 3 which show non-limiting examples of *S. uberis* common surface proteins. Further, Figure 4 shows non-limiting examples of nucleic acid and amino acid sequences of these selected putative surface proteins/virulence factors of *S. uberis.*

A low number of bacteria in the milk or on or in an udder is often found under field conditions and does not need to be harmful to an animal. Mastitis may develop when the number of bacteria, for example *S.uberis* organisms, increases in the milk or in the udder. An immune response, elicited by proteins

or immunogenic parts thereof according to the invention, is preferably effective in inhibiting at least in part the bacterial growth of *Streptococcus uberis* organisms in an udder. Decreasing the numbers of *S.uberis* organisms in the direct environment also helps preventing mastitis. The present invention discloses how to prevent and/or decrease *S.uberis* mastitis by immunising the cows, thereby keeping the number of S.uberis organisms low. Said low level of S.uberis organisms is further kept low by applying a hygienic regime at milking for example by cleaning the udder, the teats, and all apparatuses that come into contact with the udder and/or the teats.

Recombinant and/or isolated surface proteins derived from *S.uberis,* as provided by the invention, are in one embodiment produced by a production system using a prokaryotic cell or a eukaryotic cell. Examples of cells with a well developed host/vector systems for production of recombinant protein are for example for the bacteria: *Escherichia, Bacillus, Pseudomonas, Serratia, Brevibacterium, Corynebacterium, Streptococcus* and *Lactobacillus;* and for the yeasts: *Saccharomyces, Kluyveromyces, Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces, Yarrowia, Trichosporon, Rhodosporidium, Hansenula, Pichia* and *Candida;* and for the fungi: *Neurospora, Aspergillus, Cephalosporium* en *Trichoderma.*

For production of a recombinant protein of interest, the gene, encoding said protein or part thereof is either integrated in the genome for example by homologous recombination or at random, or said gene is placed in a plasmid vector or in a phage vector, which is stably maintained and expressed in the selected microorganism or cell. For the expression of the selected DNA construct in the microorganism or cell, the gene is transcribed and translated under the control of a promoter and a terminator. Preferably said promoter and terminator are suitable for the selected microorganism. Promoters and terminators suitable for various micro-organisms are disclosed in "Biseibutsugaku Kisokoza (Basic Microbiology), Vol. 8, Genetic Technology, Kyoritsu Shuppan (1990)", and those preferred for yeasts in "Adv. Biochem.

Eng. 43, 75-102 (1990)" and in "Yeast 8, 423-488 (1992)". For example, suitable plasmid vectors for *Escherichia*, more specifically for *Escherichia coli* are the plasmids of the pBR and pUC series, and suitable promoters comprise *lac* promoter (ß-galactosidase), *trp* operon (tryptofaan operon), and *tac* promoter (*lac-trp* hybride promoter) and promoters derived from λ-faag PL or PR. Preferred terminators comprise *trp*A- or phage derived *rrn*B ribosomal terminator. Plasmid vectors suitable for recombinant production in *Streptococcus* comprise for example pHV1301 (FEMS Microbiol. Lett. 26, 239 (1985)) and pGK1 (Appl. Environ. Microbiol. 50, 94 (1985)). Plasmid vectors suitable for recombinant production in *Lactobacillus* comprise for example those disclosed for *Streptococcus*, like for example pAMß1 (J. Bacteriol. 137, 614 (1979)). Plasmid vectors suitable for recombinant production in *Saccharomyces*, preferably *Saccharomyces cerevisiae*, comprise for example vectors of the series YRp, YEp, YCp en YIp. An integration vector (EP5327456) constructed by applying homologous recombination of ribosomal DNA with multicopy in the chromosome is suitable for the insertion of multicopy and for stable gene control. Plasmid vectors suitable for recombinant production in *Kluyveromyces*, preferably *Kluyveromyces lactis*, comprise for example the 2 µm plasmid series derived from *Saccharomyces cerevisiae*, plasmids of the pKD1 series (J. Bacteriol. 145, 382-390 (1981)), and pGK11-derived plasmid involved in killer activity, plasmid of the KARS series with the autonomous replication gene of *Kluyveromyces* and an integration vector (EP 537456). Plasmid vectors suitable for recombinant production in *Pichia* comprise for example the host vector system developed in *Pichia pastoris* using a gene, which is involved in autonomous replication in *Pichia* (Mol. Cell. Biol. 5, 3376 (1985). Plasmid vectors suitable for recombinant production in *Candida* comprise for example the host vector system developed in *Candida maltosa*, *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. (Agri. Biol. Chem. 51, 51, 1587 (1987). Plasmid vectors suitable for recombinant production in *Aspergillus*, comprise for example a vector constructed by integration of the gene in the

plasmid or chromosome and the promoter for extracellular protease or amylase (Trends in Biotechnology 7, 283-287 (1989)). Plasmid vectors suitable for recombinant production in *Trichoderma* comprise for example the host vector system developed in *Trichoderma reesei*, and the promoter for extracellular cellulase, which is suitable for construction of the vector (Biotechnology 7, 596-603 (1989)).

Preferably, said production system is provided with a nucleic acid construct, preferably a DNA construct, encoding for a protein of Table 5 and/or Table 6 or an immunogenic part thereof.

In another embodiment, said production system is provided with a DNA construct encoding for two or three or four or even more proteins of Table 5 and/or Table 6, or an immunogenic part thereof.

In yet another embodiment, said production system is provided with at least two DNA constructs, each encoding for at least one protein of Table 5 and/or Table 6, or an immunogenic part thereof.

In a preferred embodiment, said protein of Table 5 and/or 6 is selected from the group consisting of P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, and P105. Even more preferred said protein of Table 5 and/or 6 is selected from the group consisting of P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, and P105. Most preferred, said protein of Table 5 and/or 6 is selected from the group consisting of P15, P16, P54, P28, P63, and P105.

In a more preferred embodiment, said nucleic acid construct encodes for a fusion protein, comprising immunogenic epitopes derived from more than one protein of *S.uberis*. More preferably, said fusion protein comprises epitopes derived from proteins derived from more than one *S.uberis* strain.

In another embodiment of the invention said nucleic acid construct encodes for epitopes, which have been modified to enhance the humoral and/or cellular immune response. Therefore, the present application provides a method for producing an immunogenic composition comprising at least two proteins of

S.uberis capable of eliciting an immune response against *Streptococcus uberis*, said method comprising providing a cell with a recombinant vector, said vector comprising a nucleic acid encoding at least two proteins as listed in Table 5 and/or Table 6, and/or an immunogenic part or analogue or derivative of either or both of said proteins. For recombinant production of a protein from a nucleic acid, said nucleic acid is preferably placed under the control of an inducible regulatory sequence capable of enhancing the expression of said protein, preferably resulting in a higher protein yield. Preferably the accumulation of said recombinant protein or immunogenic part thereof is either cytoplasmic, for example in those cases wherein the produced recombinant protein is harvested from the cells, or the protein is excreted, for example when the produced protein is harvested from the culture fluid. Therefore, the recombinant construct encoding said immunogenic protein is provided with the correct regulatory sequences and/or a functionally linked promoter for intracellular or extracellular accumulation.

Therefore, the present invention provides a recombinant molecule comprising a nucleic acid sequence encoding at least two proteins as listed in Table 5 and/or Table 6, and/or an immunogenic part or analogue or derivative of either or both of said proteins under the control of a functionally linked promoter. In a preferred embodiment, said protein as listed in Table 5 and/or 6 is selected from the group consisting of P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, and P105. Even more preferred said protein as listed in Table 5 and/or 6 is selected from the group consisting of P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, and P105. Most preferred, said protein as listed in Table 5 and/or 6 is selected from the group consisting of P15, P16, P54, P28, P63, and P105.

The application also provides a live recombinant carrier comprising a nucleic acid sequence of the invention or a recombinant DNA molecule of the invention. In a preferred embodiment, the carrier is a first *S.uberis* strain and

the recombinant nucleic acid encodes immunogenic epitopes of another *S.uberis* strain. Therefore, the present invention provides a live recombinant carrier comprising a nucleic acid sequence encoding one or more proteins as listed in Table 5 and/or Table 6, and/or an immunogenic part or analogue or derivative of either or both of said proteins under the control of a functionally linked promoter. Of course, said live recombinant carrier is also immunogenic when killed. Therefore, the present invention also discloses a killed recombinant carrier.

The application further provides an isolated host cell comprising a nucleic acid sequence encoding one or more proteins as listed in Table 5 and/or Table 6, and/or an immunogenic part or analogue or derivative of either or both of said proteins under the control of a functionally linked promoter. An isolated host cell for example comprises a bacterial cell such as for example: *Escherichia, Bacillus, Pseudomonas, Serratia, Brevibacterium, Corynebacterium, Streptococcus uberis, Streptococcus suis, Lactobacillus,* or a yeast such as for example*: Saccharomyces, Kluyveromyces, Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces, Yarrowia, Trichosporon, Rhodosporidium, Hansenula, Pichia, Candida,* or a fungus such as for example: *Neurospora, Aspergillus, Cephalosporium,and/or Trichoderma.*

With the abovementioned isolated host cell comprising a recombinant molecule comprising a nucleic acid sequence encoding one or more proteins as listed in Table 5 and/or table 6, and/or an immunogenic part or analogue or derivative of either or both of said proteins under the control of a functionally linked promoter the present invention discloses to a skilled person how to produce a recombinant proteinaceous molecule. Because of variation between different *S.uberis* strains, proteins and peptides from various strains may show a slight variation in amino acid sequence and yet have the same function. Therefore, a proteinaceous molecule derived from one *S.uberis* strain has sequence identity to a functionally identical proteinaceous molecule of another *S.uberis* strain. "Sequence identity" refers to the percent sequence identity between two amino

acid sequences or nucleotide sequences after aligning the two sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent sequence identity. Methods and computer programs for the alignment are well known in the art. One computer program which may be used or adapted for purposes of determining whether a candidate sequence falls within this definition is "Align 2", authored by Genentech, Inc., which was filed with user documentation in the United States Copyright Office, Washington, D.C. 20559, on Dec. 10, 1991. Two amino acid sequences, have a high degree of "sequence identity" to each other when the sequences exhibit at least about 80%, preferably at least about 90%, and most preferably at least about 95% sequence identity of the molecules after alignment. Therefore, the present application discloses an isolated and/or recombinant proteinaceous molecule that has at least 80% sequence identity to a protein encoded by a nucleic acid according the invention. In a preferred embodiment, the invention discloses an isolated and/or recombinant proteinaceous molecule that has at least 95% sequence identity to a proteinaceous molecule encoded by a nucleic acid according to the invention.

To induce or elicit an immune response in an animal against a protein or an immunogenic part of the invention, said animal is provided with a protein and/or an immunogenic part that comprises at least one immunogenic site. An immunogenic part or site of a protein is formed by one or more epitopes and thus is capable of eliciting an immunological response. An immunogenic site comprises preferably at least 5 amino acids, more preferably at least 10-15, and most preferably 25 or more consecutive amino acids. The invention in another preferred embodiment provides a protein or an immunogenic part thereof comprising at least a stretch of 25 consecutive amino acids of a proteinaceous molecule encoded by a nucleic acid according to the invention. Preferably said stretch of at least 25 consecutive amino acids comprises an immunogenic site. A recombinant nucleic acid molecule in a preferred embodiment encodes for at least one protein or a fusion protein encoding for at

least two proteins or immunogenic parts thereof. In a preferred embodiment, said fusion protein comprises immunogenic parts of proteins of at least two strains of *S.uberis*. Therefore, the invention discloses a nucleic acid encoding a proteinaceous molecule according to the invention.

Expression of said nucleic acid in a host cell provides an immunogenic protein of the invention. Said immunogenic protein is preferably incorporated into an immunogenic composition of the invention. Therefore, the present invention provides an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against *Streptococcus uberis,* said composition comprising an isolated and/or recombinant proteinaceous molecule according to the invention.

Said recombinant protein of the invention is produced by a host cell. As a host cell, bacterial species such as for example an *E.coli* and/or yeast or fungi or eukaryotic cells are used for the production.

An immunogenic composition incorporating an isolated or recombinant protein, and/or a cell exposing said protein is capable of eliciting an immune response against *Streptococcus uberis,* when administered to an animal, preferably a cow. Preferably, said cell comprising a nucleic acid of the invention under a suitable regulatory sequence expresses said protein on the surface. Such a cell is called a carrier cell. Said carrier cell preferably is incorporated in the immunogenic composition of the invention. Preferably, said cell carrying said immunogenic protein is a live recombinant carrier, but in another embodiment said carrier cell is capable of eliciting an immune response when the cell is killed by for example formalin treatment. Therefore, the present invention provides an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against *Streptococcus uberis,* said composition comprising a live or killed recombinant carrier of the invention. Because a cause of mastitis in cows is *Streptococcus uberis*, in a preferred embodiment of the invention, said live or killed recombinant carrier is a *Streptococcus* species. In one embodiment of the invention, said host cell is a *streptococcus* species.

The proteinaceous molecule is then preferably presented in the context of other

streptococcal proteins, which enhances eliciting an immune response. Furthermore, the immunogenicity can be enhanced by over-expression of the recombinant proteins on the surface of the host cell, preferable a streptococcal cell. In addition, the use of different strains of streptococcal host cells enhances the immunogenicity of the immunogenic proteins or parts thereof. Therefore, the present invention also provides an immunogenic composition according to the invention, wherein said host cell is a *streptococcus* species. There are several streptococcus species that are also suitable as a host cell, for example, *S. suis* or *S. agalactiae* or *S. dysgalactiae.*

Because of differences between various *streptococcus* species, and because some proteins, naturally occurring on *Streptococcus uberis,* are capable of assisting in eliciting an immune response against *Streptococcus uberis,* in a preferred embodiment, attenuated *Streptococcus uberis* is used as a live recombinant carrier in an immunogenic composition of the invention.

Preferably, said *S.uberis* organism expresses proteins of another strain of *S.uberis,* thereby disclosing a differentiating vaccine, because the serum of an animal vaccinated with said vaccine is discernible from the serum of an animal infected with a field infection, by detecting antibodies against proteins of both strains. In another embodiment, said *S.uberis* organism is replaced as a host cell or as a live or killed carrier by an *S.suis,* or a *Staphylococcus* species or an *E.coli,* either live or killed.

Administering an immunogenic protein of the invention or a part thereof, or administering a nucleic acid encoding said protein of the invention elicits an immune response. Said nucleic acid, when administered to a cow, is expressed in cells of said cow and recognized by the immune system of said cow. The nucleic acid is thereby acting as an immunogenic composition, like for example a DNA vaccine against mastitis. Therefore, the present invention provides an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against *Streptococcus uberis,* said composition comprising a nucleic acid of the invention.

Because the immunogenic composition of the invention elicits an immune response in an animal, preferably a cow, the protein of the invention reduces illnesses related to mastitis and improves the health of said cows, thereby rendering cows much more resistant to other (secondary) infections. Therefore, the present invention provides an immunogenic composition according the invention for use as a medicament.

Preferably, the immunogenic composition of the invention is used to manufacture a medicament against *Streptococcus uberis* mastitis that reduces specific illness as a result of mastitis caused by *Streptococcus uberis*. Therefore, the present invention provides the use of an immunogenic composition according to the invention for the preparation of a medicament against *Streptococcus uberis* mastitis.

An immunogenic composition of the invention is also used to produce or formulate a vaccine against mastitis. A vaccine generally prevents animals or humans from contracting a disease. Preferably, the immunogenic composition of the present invention is capable of preventing mastitis. Therefore, the present invention discloses in a preferred embodiment the use of an immunogenic composition according to the invention for the preparation of a vaccine.

In another embodiment, the immunogenic composition of the invention is preferably used for decreasing and/or controlling the numbers of *S.uberis* organisms in the milk and/or in the udder of the cow. The milking process on a dairy farm comprises a potential danger of transferring *S.uberis* organisms from a diseased cow to another cow. The decrease in numbers of *S.uberis* organisms is therefore most suitable to suppress the spread of the infection from udder teat to udder teat and/or from animal to animal.

For administration of an immunogenic composition of the invention to a subject, admixing the proteins or immunogenic parts thereof or host cells with a suitable carrier facilitates the acceptance by a subject of the immunogenic composition and increases the immunogenic effect of the composition. A

suitable carrier of the invention comprises for example a suitable adjuvant to increase the immunising effect of said immunogenic composition. Many suitable adjuvants, both based on oils and water-based, are known to a person skilled in the art, for example Diluvacforte® adjuvant or Specol® adjuvant. In one embodiment, said suitable carrier comprises for example a solution like for example saline for diluting bacteria or proteins or immunogenic parts thereof. Therefore, the present invention discloses a pharmaceutical composition comprising an immunogenic composition of the invention and a suitable carrier.

In an animal, preferably a cow, which is immunised with an immunogenic composition of the invention, antibodies are produced that are directed against *S.uberis*. The presence and the level of said antibodies are indicative for the immunity after immunisation with an immunogenic composition or a vaccine of the invention. Said antibodies are preferably not directed against epitopes that were present as wild type *S.uberis* strains in the field. For discerning a vaccinated animal from an animal that had a field type infection, the immunity of said vaccinated animal is in one embodiment preferably measured by measuring antibodies directed against said immunogenic composition of the invention. The antiserum of said vaccinated cow is also tested for the presence of antibodies against *S.uberis* antigens, which are not present in the immunogenic composition. Detecting antibodies against an *S.uberis* antigen not present in the immunogenic composition or vaccine of the invention is an indication of a wild type infection. Therefore, the present invention discloses a method for measuring the immunity of an animal against *S.uberis,* said method comprising determining in at least one sample from said animal the presence of antibodies directed against a protein selected from Table 5 and/or Table 6, or an immunogenic part thereof. In a preferred embodiment, said protein selected from Table 5 and/or 6 is selected from the group consisting of P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93,

P100, and P105. Even more preferred said protein selected from Table 5 and/or 6 is selected from the group consisting of P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, and P105. Most preferred, said protein selected from Table 5 and/or 6 is selected from the group consisting of P15, P16, P54, P28, P63, and P105.

For the detection of antibodies, which bind to the immunogenic composition of the invention, a diagnostic kit is suitable which comprises at least one of the proteins of Table 5 and/or Table 6 or an immunogenic part thereof. Binding of an antibody to said protein or immunogenic part thereof is detected by means of for example immunefluorescent antibody detection or enzyme-linked antibody detection or any other means of detection of antibody bound to said protein or immunogenic part thereof.

In a preferred embodiment, said at least one of the proteins of Table 5 and/or 6 is selected from the group consisting of P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, and P105. Even more preferred said at least one of the proteins of Table 5 and/or 6 is selected from the group consisting of P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, and P105. Most preferred, said at least one of the proteins of Table 5 and/or 6 is selected from the group consisting of P15, P16, P54, P28, P63, and P105.

Therefore, the present invention discloses a diagnostic kit comprising at least one protein selected from Table 5 and/or table 6, or immunogenic part thereof and a means of detecting antibody binding to said protein or immunogenic part thereof. Such a diagnostic kit is for example an ELISA test, or any other test suitable for screening sera. Preferably said test kit is suitable for screening large numbers of sera.

In another embodiment, a nucleic acid of the invention is used for the detection of animals infected with wild type *S.uberis* strains in a population of animals

vaccinated with an immunogenic composition or a vaccine of the invention. This detection is for example achieved by using a PCR.

The present patent application discloses that successful immunogenic proteins of the invention are proteinaceous molecules and/or proteins accessible to antibodies at the bacterial surface and common to a number of *S.uberis* strains. As an example, surface proteins were identified from the genome sequences of strains 41-241 and O140J by selecting for genes containing one or more sequences commonly found in surface proteins of gram-positive bacteria, like for example a LPXTG sortase motif required for anchoring of the protein to the cell wall, or a lipid attachment motif required for lipoproteins, or a signal sequence or a transmembrane region predicting a surface localization of the encoded protein.

The present application discloses the presence of selected proteins in strains of *S.uberis* as examined by probing chromosomal DNA of a number of *S.uberis* strains with PCR products obtained from the genes as selected above.

The invention is further explained in the following examples. These examples do not limit the scope of the invention, but merely serve to clarify the invention. Many alternative embodiments can be carried out, which are within the scope of the present invention.

Legends to the Figures

Figure 1. FACS analysis on intact *S.uberis* strains. *S.uberis* strains 41-241 (A) and O140J (B) were incubated with mice immune-sera (dark bars) or with the corresponding pre-immune sera (light bars). Bound antibodies were detected using FITC-conjugated secondary antibodies. Data are expressed as the median of fluorescence associated with bacterial cells. A fluorescence of ≥ 10 (2 x background) was considered as being positive. Numbers of the sera used refer to the gene/protein numbers as indicated in Tables 1 to 4.

Figure 2. Coomassie brilliant blue stained 2D proteome patterns. Lysates of exponentially growing *S.uberis* strains 41-241 (A) and O140J (B) were probed with bovine sera obtained from cows after experimental infection with strain O140J. Circled proteins were identified as being immunogenic proteins. The properties of the identified proteins as analysed by in-gel tryptic digestion, MALDI-TOF mass spectrometry are shown in Table 6.

Figure 3. Infection of cows with *S.uberis* strain O140J or strain 41-421.
3 A. Cows 6716 and 6717 are infected via the milk duct with *S.uberis* strain O140 J.
Cows 6720 and 6721 are infected via the milk duct with *S.uberis* 41-421.
Notice that cow 6720 is infected with 5000 cfu *S.uberis* and 6721 is infected with 500 cfu *S.uberis.*
SSC means somatic cell counts in the milk. BO means bacterial investigation and is presented as the number of organisms as colony forming units (cfu) isolated form the milk.
RV means right anterior quarter, LA means left posterior quarter.
3 B. Clinical signs and bacterial and cytological results of cows 6718 and 6719 after infection with *S.uberis* strain O140J.

3 C. Clinical signs and bacterial and cytological results of cows 6722 and 6723 after infection with *S.uberis* strain 41-241.

Figure 4. Nucleic acid sequences and amino acid sequences of *S.uberis* proteins of table 5.

Examples

Example 1

Selection of common surface antigens

DNA sequence analysis. The DNA sequence of the *S.uberis* strain 41-241 has been determined with a 2 x coverage. Sequencing data were assembled to obtain 572 contiguous sequences containing 1815 ORFs. At the Sanger center the *S.uberis* strain O140J (Hill, 1988) has been sequenced. The sequence data available at the Sanger site in April 2002 were assembled as well, to obtain 61 contigs containing 1938 ORFs.

Selection of common surface antigens. Successful vaccine antigens are proteins accessible to antibodies at the bacterial surface and common to a number of *S.uberis* strains. Surface proteins were identified from the genome sequences of strains 41-241 and O140J by selecting for genes containing one or more sequences that form a signature motif (see M&M) commonly found in surface proteins of gram-positive bacteria. Among all ORFs analysed, 17 ORFs contained a LPXTG sortase motif (Table 1) required for anchoring of the protein to the cell wall. Four (P12, P23, P24 and P25) of these 17 proteins were exclusively found in strain 41-241.

Thirty-one ORFs contained a lipid attachment motif required for lipoproteins (Table 2).

All these proteins were found in strain O140J as well as in strain 41-241.

Moreover, 87 ORFs were selected that contained a signal sequence or a transmembrane region predicting a surface localization of the encoded protein (Table 3).

These proteins were found in strain O140J as well as in strain 41-241.

Example 2

Distribution of selected genes among various clinical and subclinical isolates of S.uberis

To examine the presence of the selected genes among various *S.uberis* strains, spot hybridization experiments were performed in which chromosomal DNA of a considerable number of clinical *S.uberis* strains was probed with PCR products obtained from 99 of the selected genes. The data (Table 4) show that most of the selected genes hybridise with most *S.uberis* strains, suggesting that most of the selected genes are commonly present among the various *S.uberis* strains. In contrast, 4 out of the 99 genes tested hybridised only with a limited number of strains. All of these genes are present in strain 41-241 and encode proteins having a LPXTG sortase motif required for anchoring of the protein to the cell wall.

Example 3

Immunogenicity of selected surface proteins.

To evaluate a role of the proteins as vaccine candidates the proteins encoded by the 115 of the selected genes were cloned and expressed in *E. coli* with polyhistidine tags. The products of 106 of these genes were successfully cloned and expressed in *E. coli.* Subsequently, sera obtained from *S.uberis* infected cows and from rabbits immunized with formalin-killed or sonicated *S.uberis* cells were tested for the presence of specific antibodies directed against the expressed proteins by Western blot analysis. The results (Table 5) show that 19 of the expressed proteins were recognized by antibodies present in sera of *S.uberis* infected animals, indicating that these proteins are expressed *in vivo* and are immunogenic in cows. Moreover, 30 of the expressed proteins were

recognized by antibodies present in sera from rabbits immunized with formalin-killed or sonicated *S.uberis* cells. Twelve of the expressed proteins were recognized both by sera obtained from *S.uberis* infected cows as well as by sera from rabbits immunized with formalin-killed or sonicated *S.uberis* cells. These data indicate that most of the proteins are antigenic.

Table 5 also shows that some proteins were recognised by antisera induced after experimental infection with both strains 41-241 and O140J. However, other proteins reacted positive exclusively with either sera obtained after infection with strain O140J or with sera obtained after infection with strain 41-241. This probably indicates differences between the two strains either in protein expression *in vivo* or in accessibility of the proteins to the immune system.

Example 4

Purification of the selected proteins.

To further evaluate a role of the proteins as vaccine candidates, all 36 proteins recognized either by sera from infected cows and/or by sera from immunized rabbits were purified. In addition, 4 proteins that contained a sortase motif but that did not react with both sera were purified. Thirty-one of the 40 selected recombinant proteins were successfully over-expressed in soluble form and could be purified under native conditions, whereas 5 proteins were expressed as insoluble inclusion bodies. These proteins were purified using denaturing conditions and the proteins were refolded after purification. For 4 proteins we were unable to purify amounts sufficient for immunization. All 36 purified proteins were subsequently used to immunize mice. As shown on Western blots none of the proteins was reactive with serum obtained from mice before immunization. In contrast however, the proteins strongly reacted with

immune serum obtained from the mice (Table 5), indicating that the proteins are highly immunogenic in mice. The specificity of the induced antibodies was confirmed by immunoblotting against lysates (or protoplast supernatants) of *S.uberis* cells. The results showed that most of the induced antibodies specifically reacted with a *S.uberis* protein of the expected molecular mass clearly indicating that these proteins represent (surface) antigens that are capable of inducing an immune response in mice.

Example 5

Functional characteristics of the induced antibodies

We used the mice sera in a FACS analysis to study the binding of antibodies to whole encapsulated *S.uberis* cells (grown in Todd-Hewitt). As shown in Fig. 1 none of the sera obtained from mice before immunisation was able to bind to whole *S.uberis* cells. In contrast, however, eight of the immune sera (sera induced against proteins P11, P15, P17, P20, P25, P26, P27, P63) strongly bound to whole bacterial cells, whereas two of the sera (directed against proteins P 17, P18) showed a weak binding to whole bacterial cells. This clearly indicates that the proteins recognised by these sera were expressed under the conditions used for growing *S.uberis* bacterial cells, and were accessible for binding to antibodies. In addition, Fig. 1 clearly shows that the expression and/or surface accessibility of the proteins differed between the two strains used. Expression and/or surface accessibility were conserved in three of the proteins (P17, P19 and P20). In contrast, P11 and P63 were exclusively detected by using strain O140J, whereas P15, P18, P25 and P26 were exclusively detected by using strain 41-241. P27 was surface exposed both on strains 41-241 and O140J, but was only weakly recognised by antiserum on strain 41-241.

Taken together, the data clearly showed that 10 of the selected antigens are expressed on the surface of the bacterium grown in vitro and are available for binding of antibody on intact encapsulated cells. Three of these proteins were conserved among the two strains used.

Example 6

Serological proteome approach. As an alternative approach for the identification of S.uberis vaccine candidates, serological proteome analysis was applied.

Proteins of *S.uberis* strains grown in TH broth were separated by 2D gel electrophoresis and probed with antibodies present in sera of *S.uberis* infected animals. A number of highly immunogenic *S.uberis* proteins were identified (data not shown). Three spots were successfully matched to proteins present on a Coomassie brilliant blue stained 2D gel (Fig. 2). From these proteins tryptic digestion products were analyzed by Q-TOF and the resulting peptide-mass fingerprints were compared with the *in silico* generated peptide-mass fingerprints of all proteins predicted from the genome sequence analysis of strains 41-241 and O140J. In addition, two major tryptic peptides selected from each fingerprint were used for tandem MS. The resulting amino acid sequence of the peptides was subsequently compared to sequences predicted from the *S.uberis* genome sequences. All three proteins could be matched successfully using this procedure. The properties of the identified proteins are listed in Table 6. One of these vaccine candidates was also identified using the genomic approach (P63). This underlines the importance of this protein as a vaccine candidate.

Example 7

ELISA on culture supernatant with mice immune-sera

P93 en P105 were strongly recognised in culture supernatants of both strains indicating that these proteins are secreted by the bacteria.

Example 8

FACS analysis using S.uberis cells grown in whey to mimic in vivo conditions.

The procedure of example 5 was followed to test binding of antibodies to *S.uberis* cells that were grown in a medium resembling milk.

Example 9

Conservation of antigens among diverse *S.uberis* strains.

The conservation of the expression of the selected proteins and the accessibility to antibodies among diverse *S.uberis* isolates by FACS analysis are studied. These studies allow selection of vaccine candidates directed to various *S.uberis* strains.

Example 10

Vaccination and challenge in cattle.

Experimental infection of non-vaccinated animals. The virulence of the *S.uberis* strains O140J and 41-241 was determined after experimental infection. An udder is divided in four parts, generally called the quarters. Each quarter comprises milk secreting cells, milk ducts, a milk cistern and a teat. In this experiment, each quarter is individually infected in the milk cistern through the milk duct in the teat. Six out of eight quarters inoculated with strain O140J became successfully infected (Fig. 3, Table 7). Pure cultures of

S.uberis O140J were isolated from milk obtained from these quarters and increased levels of somatic cell count (SCC) were detected. In two quarters (of two different cows; cows 6717 and 6719; Figs 3A and 3B) no infection could be detected after challenge. Both quarters remained bacteriological negative during the course of the experiment. In one of the two quarters a slight increase in SCC was observed. In contrast, in all eight quarters challenged with strain 41-241 infection was established (Figs. 3A and 3C; Table 7). Four of these quarters (cows 6721 and 6723) were inoculated with a dose of 5×10^2 cfu of strain 41-241, whereas the other four quarters were inoculated with a dose of 5×10^3 cfu (cows 6720 and 6722). More severe effects were observed after inoculation with the higher dose: body temperature of the cows increased more significantly and more severe clinical signs of disease (clots in milk and firm consistency of udder) were observed (Table 7; Figs 3A and 3C). However, clinical signs of mastitis were also induced using strain 41-241 at an inoculation dose of 5×10^2 cfu . Similar data had previously been observed for strain O140J (Hill, 1988).

Compared to strain 41-241, the clinical signs of mastitis obtained with strain O140J (inoculation dose of 5×10^2 cfu and studied for 16 days) seemed more severe (Figs.3B and 3C). Three out of four quarters became successfully infected with strain O140J and all three showed clinical signs of mastitis for at least 16 days after infection. Two of these quarters remained bacteriological positive for 16 days after infection (Fig. 3B) and in one quarter an increased level of SCC was detected for 35 days (data not shown). All four quarters infected with strain 41-241 showed clinical signs of mastitis for 10-13 days after inoculation, but were negative for clinical signs from day 13 onwards (Fig 3C). Two of these quarters (cow 6723) remained bacteriological positive during the course of the experiment (16 days), indicating the persistence of *S.uberis* in the mammary gland (Fig.3C).

Histological examination of udder material collected 3-5 days after infection generally corresponded to the clinical observations. Both cows infected with

strain 41-241 and one cow infected with strain O140J displayed a moderate to severe mastitis throughout the entire gland with multifocal intra-alveolar accumulation of polymorpho-nuclear granulocytes, focal disruption of the epithelial layer in the alveoli and moderate interstitial infiltration of mononuclear cells (data not shown). The second cow infected with strain O140J had a mild, multifocal catarrhal mastitis.
Taken together, these data show that both strains O140J and 41-241 are pathogenic for cows.

Immunization of dairy cows

Polyclonal antibodies against *S.uberis* proteins were raised in cows. Cows were immunized through various immunization schedules, using either subcutaneous inoculation, and/or intramuscularly and/or intra-mammary inoculation.
The immunogenic composition was formulated with an solvent like for example phosphate buffered saline and an adjuvant, for example water-in-oil adjuvant or an adjuvant without oil.
After immunization, a blood sample was collected and serum was tested for antibodies against *S.uberis.*

Experimental infection of vaccinated animals.

Vaccinated and non-vaccinated cows were challenge infected with 500 cfu *S.uberis* strain O140J. Each udder quarter was individually infected via the milk duct in the teat.
After challenge, cows vaccinated with an immunogenic composition of the invention showed less clinical signs of mastitis, less alterations in the milk, lower SCC levels, shorter period of clinical mastitis, less fever. Clinical scores and histological evidence of the udders clearly show that immunization according to the present invention is effective against mastitis caused by *S.uberis.*

Example 11

Reactivity of antigens with convalescent sera. The ability of a selected number of proteins (P15, P16, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P68, P75, P93 and P105) to induce convalescent antibodies was tested by Western blot analysis using field sera obtained from 14 cows having recovered from a recent *S. uberis* infection. Six out of 12 antigens selected (P15, P16, P54, P28, P63, P105) were recognized by all 14 convalescent sera used. These data indicate that these antigens are expressed by all *S. uberis* strains that caused the respective infections, that these antigens are expressed during infection in the host and that these antigens are highly immunogenic. Five of the antigens (P 68, P27, P20, P93 and P22) were recognized by 8, 9, 10, 11 or 12 of the convalescent sera respectively. With one of the antigens no reaction with any of the convalescent sera could be detected (P75).

Example 12

Conservation of antigens among diverse *S. uberis* strains. To indicate the suitability of the antigens for conferring protection against various *S. uberis* strains, the conservation and expression of the 12 selected antigens (P15, P16, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P68, P75, P93 and P105) among a collection of recently isolated field strains (35 strains) was determined. Expression of antigens was demonstrated by screening Western blots with mouse immune sera against the purified antigens. Five out of the 12 antigens (P15, P16, P28, P75, and P105) were expressed in >97% of the strains tested; two of the antigens (P27, P63) were expressed in 94% of the strains and four of the antigens (P20, P22, P54, P93) were expressed in 81-92% of the strains. These data clearly showed that expression of the most of the antigens is highly conserved among the various *S. uberis* strains.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions.

One *S.uberis* strain 41-241 was isolated in 1998 from a commercial Dutch dairy farm on which an outbreak of *S.uberis* mastitis was observed (Hill, 1988). Strain 41-241 showed the RAPD fingerprinting type B predominantly found on the particular herd during the outbreak (Zadoks et al., 2003). The strain was isolated from a cow infected with *S.uberis* for at least two months. The onset of the infection was sub clinical and was followed by multiple clinical flare-ups.

The *S.uberis* strains O140J and EF20 were kindly provided by Dr. J. Leigh, Institute for Animal Health, Compton, England. Other *S.uberis* and *S. parauberis* strains, isolated from clinical cases of mastitis on various Dutch dairy farms were kindly provided by Dr. D. Mevius, CIDC, Lelystad, The Netherlands; by Drs. O. Sampimon, Animal Health Service, Deventer, The Netherlands, or by Dierenartsen Praktijk, Diessen, The Netherlands. All other streptococcal species were from the laboratory collection of the ASG, Lelystad, The Netherlands. Streptococcal strains were grown in Todd-Hewitt broth (code CM189, Oxoid), and plated on Columbia agar blood base (code CM331, Oxoid) containing 6% (v/v) horse blood and 0.1% aesculin (w/v) unless indicated otherwise. *E.coli* strains were grown in Luria broth (18) and plated on Luria broth containing 1.5% (w/v) agar. If required, 50 µg/ml of kanamycin was added.

Preparation of whey. Bulk milk was obtained from a dairy farm without a *S.uberis* infection in its history (Waiboerhoeve, Lelystad, The Netherlands). The milk was centrifuged for 30 minutes at 12,800 x *g* and fat was removed. Subsequently, 40 µl/ml of rennin (Lactoferm, Brouwland, Belgium) was added and the milk was incubated for 2 hr at 37°C with regular mixing. Coagulated milk was removed by sifting and the remaining supernatant was centrifuged

for 30 minutes at 12,800 x *g*. The cleared supernatant was sterilized by filtration over a 0.2 um Sartobran P filter (Sartonus, Goettingen, Germany).

Milk samples and sera. Milk samples and sera were obtained from clinical *S.uberis* mastitis cases from various Dutch dairy farms (Drs. O. Sampimon, Animal Health Service, Deventer, The Netherlands). None of the animals had been treated with antibiotics before the samples were collected.

In addition, milk and sera were collected from cows at various time points after experimental infection with *S.uberis* strains O140J and 41-241.

Rabbit antisera. Polyclonal antibodies directed against formalin-killed whole *S.uberis* cells as well as against sonicated *S.uberis* cells were raised in rabbits. Rabbits were immunized subcutaneously using 2-4 x 10^9 killed cells in water-in-oil adjuvant. Inoculations were repeated two, three and four weeks later. After 6 weeks, rabbits were killed and serum was collected.

To prepare the antigens, *S.uberis* strains were grown for 16 h in Todd-Hewitt broth. The cultures were diluted 10 times in 1 l pre-warmed Todd-Hewitt broth and cells were grown till optical density (600 nm) reached 0.5. The cultures were centrifuged for 15 min at 10,000 x *g*, and the pellets were dissolved in 100 ml of PBS (136.89 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 2.79 mM KH_2PO_4 pH 7.2). Subsequently, the optical density (600 nm) was adjusted to 1.0 with PBS. To prepare formalin-fixed cells 10 ml portions of these cells were centrifuged for 20 min. at 10,000 x g and the pellets were resuspended in 2.5 ml of PBS. To this suspension 250 µl of 3% formalin was added and it was maintained for 16 h at room temperature. The suspension was checked for the absence of live bacteria by plating on Columbia Agar plates. To remove formalin the cells were washed twice with PBS. To prepare sonicated cells 10 ml portions of the cells were centrifuged for 20 min. at 10,000 x g and the pellets were resuspended in 250 µl of PBS. Cells were sonicated for 15 min using a tip sonifier at 100% output, 50% duty cycle. After sonication, cells were diluted 10 times in PBS. Both antigens were mixed 1:1 with Specol to produce water-in-oil emulsions.

Genome sequencing. Genomic DNA was isolated from *S.uberis* strain 41-241 as described by Sambrook et al. (1989). DNA was sheared and used to create a plasmid library. Random clones were sequenced using dye-terminator chemistry and analyzed with an ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems, Warrington, GB). Sequencing data were assembled to obtain 572 contiguous sequences. An initial set of open reading frames (ORFs) was identified with GLIMMER and GENEMARK software. Transmembrane helices and subcellular locations in the genes were predicted with a computer program called TMHMM available at www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM. To search each ORF for the presence of signal peptides the program SignalP was used (Nielsen et al., 1999). Alternative predictions of signal peptides were done using the program PSORT available on http://psort.nibb.ac.jp and a program called GCG-SPScan available at http://www.biology.wustl.edu /gcg/spscan.html. Lipoproteins were found by using the GCG-Findpatterns program with the following expressions: PS00013: ~(D,E,R,K)6(L,I,V,M,F,W,S,T,A,G)2(L,I,V,M,F,Y,S,T,A,G,C,Q)(A,G,S)C ; g-lpp:<(M,V)X{0,13}(R,K)~(D,E,R,K,Q){6,20}(L,I,V,M,F,E,S,T,A,G)(L,V,I,A,M)(I,V,M,S,T,A,F,G)(A,G)C and g-lpp_rvh: (M,V,L)X{0,13}(R,K)~(D,E,R,K,Q){6,20}(L,I,V,M,F,E,S,T,A,G)(L,V,I,A,M)(I,V,M,S,T,A,F,G)(A,G)C. Proteins with cell wall anchor domains were identified using InterPro accession IPR001899. The BLAST program was used to search for protein sequences with sequence identity to the deduced amino acid sequences.

Spot blotting, Southern blotting and hybridization. Chromosomal DNA was isolated as described by Sambrook et al. (1989). For spot blotting one μg of chromosomal DNA was spotted onto Genescreen Plus membranes. The membranes were incubated in 0.4 M NaOH-1 M NaCl at room temperature for 10 min. to denature the DNA and for 10 min in 0.6 M NaCl, 0.06 M sodium citrate (pH 7.0) for neutralization. For Southern blotting DNA fragments were separated on 0.8% agarose gels and transferred to Gene-Screen Plus

membranes (NEN) as described by Sambrook et al. (1989). DNA probes were labeled with [(α-^{32}P]dCTP (3000 Ci mmol^{-1}; Amersham) by use of a random primed labeling kit (Boehringer). The DNA on the blots was hybridized at 65°C in a buffer having 0.5 M sodium phosphate, 1 mM EDTA, and 7% sodium dodecyl sulphate at a pH of 7.2, with the appropriate DNA probes as recommended by the supplier of the Gene Screen Plus membranes. After hybridization, the membranes were washed twice with a solution of 40 mM sodium phosphate, pH 7.2, 1 mM EDTA, 5% SDS for 30 min at 65°C and twice with a solution of 40 mM sodium phosphate, pH 7.2, 1 mM EDTA, 1% SDS for 30 min at 65°C. Signals were detected on a phosphor-imager (Storm; Molecular Dynamics).

Cloning and expression of selected proteins. Selected ORFs were amplified by PCR with specific oligonucleotide primers for cloning into pET200/D-TOPO (Invitrogen). Proteins were cloned without putative signal sequences or predicted transmembrane regions. Constructs were transformed into *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen) for expression of recombinant proteins.

For PCR reaction (25 µl) Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen) was used as described by the supplier. DNA amplification was carried out in a Perkin Elmer 9700 thermal cycler and the program consisted of an incubation for 5 min at 94°C, 35 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at 57°C and 2 min at 68°C, and 5 min at 68°C.

Immunodetection of the expressed antigens. Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis using the XCell *SureLock* mini-cell system (Invitrogen). Proteins in the gel were visualized using SYPRO-orange (Molecular Probes, Sunnyvale, Calif.) staining according to the manufacturer's recommendations. Signals were detected on a phosphor-imager (Storm; Molecular Dynamics).

Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane by standard procedures (19). The membranes were blocked in Blotto: Tris-buffered saline

(TBS) (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl) containing 4% skimmed milk, 5% foetal calf serum and 0.05% Tween 20, at room temperature (RT) for 16 h. To detect recombinant antigens, membranes were incubated with a monoclonal antibody against the 6 x HIS tag (Clontech, Palo Alto, CA.). Bound antibodies were detected and visualized using alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse antibody and nitro-blue-tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate as described by Sambrook et al. (1989).

Immunogenicity of expressed antigens was tested by using serum samples obtained from cows clinically or sub clinically infected with *S.uberis* or using rabbit anti-*S.uberis* antisera. Bound antibodies were detected with rabbit-anti-cow or goat-anti- rabbit immunoglobulins conjugated with alkaline phosphatase (Jackson Immunoresearch) and visualized using nitro-blue-tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate as described by Sambrook et al. (1989).

Protein purification. Proteins were affinity purified from solubilised cell pellets using Ni-nitrilotriacetic acid (Ni^{2+}-NTA) column chromatography as described by the manufacturer (Qiagen). In short, cells were grown exponentially; 1 mM IPTG was added and the cells were allowed to grow another 4 hr at 37°C. Subsequently, cells were harvested and lysed. The cleared supernatants were loaded onto Ni^{2+}-NTA agarose columns. The columns were washed and the protein was eluted. Different buffers were used for native and for denaturing purification. Proteins purified under denaturing conditions were renaturated by dialysis using a linear 6 M - 0 M urea gradient in 286,89 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 2.79 mM KH_2PO_4 pH 7.2. Purified proteins were further concentrated using Amicon Ultra-4 5000 MWCO filters (Millipore).

Protein concentration. Protein concentration in the samples was determined after SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins in the gel were visualized using SYPRO-orange (Molecular Probes, Sunnyvale, Calif.) staining according to the manufacturer's recommendations. Signals were

detected on a phosphor-imager (Storm; Molecular Dynamics). A known bovine serum albumin concentration range was used as a standard, to calculate the amounts of protein present in the gel. The Molecular Dynamics program was used for the calculations.

Immunogenicity of purified proteins. OF1 mice were immunized subcutaneously using 20 µg of purified proteins in Freunds complete adjuvant. Inoculations were repeated three weeks later using 20 µg of purified proteins in Freunds incomplete adjuvant. Three weeks after the second inoculation mice were killed and serum was collected.

FACS-analysis. *S.uberis* cells were grown in Todd-Hewitt broth until the OD_{600} reached 0.5. The cells were collected by centrifugation, washed once in FACS-buffer (PBS-13, pH7,2 [137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4, 2.8 mM KH_2PO_4] - 0,5%BSA) and the cell density was adjusted to approximately OD_{600} 1.0 in FACS buffer. The cells (250 µl) were collected by centrifugation and resuspended in 50 µl of FACS-buffer containing mice antisera (in a 1: 50 dilution). The sample was incubated for 45 minutes on ice. To remove unbound antibodies the cells were washed twice with 250 µl of FACS-buffer. Subsequently cells were incubated with 50 µl FACS buffer containing fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled rabbit-anti-mouse secondary antibody (1: 100 dilution; DAKO A/S, Glostrup, Denmark) for 30 minutes on ice. Cells were washed twice with 250 µl of FACS-buffer, resuspended in 100 µl FACS-buffer and bound antibody was detected a fluorescence activated cell sorter (FACS Calibur, Benton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

Whole cell ELISA. Exponentially growing *S.uberis* cells were collected by centrifugation, resuspended in coating buffer pH 9,6 (0,05M $NaHCO_3$, 0,05M Na_2CO_3) and cell density was adjusted to OD_{600} 1.0. High binding 96-wells plates were coated with 100 µl of this suspension per well for 16 hr at 4°C. Wells were washed 4 times with ELISA buffer (5% Tween-80, 0,02% Na-azide), sera (diluted 1:20 in PBS-13 containing 0,05% Tween-80, 2% NaCl, and 5%

fetal calf serum) were added and plates were incubated for 1 hr at 37°C. To remove unbound antibodies, wells were washed four times with ELISA buffer. Subsequently, secondary antibody (100 µl of horse radish peroxidase conjugated rabbit-anti-mouse (DAKO) diluted 1:250 in PBS-13 containing 0,05% Tween-80, 2% NaCl, and 5% fetal calf serum) was added and plates were incubated for 1 hr at 37°C. Wells were again washed four times with ELISA buffer and bound antibodies were detected at room temperature using 100 µl of tetramethylbenzidine (TMB) (CeDi-Diagnostics, Lelystad, The Netherlands). Reactions were stopped after 15 min by the addition of 100 µl of 0,5M H_2SO_4 per well. Absorbance was read using an ELISA reader (Thermo Labsystems, Franklin, USA) at 450 nm.

Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *S.uberis* strains were grown for 16 h in 100 ml Todd-Hewitt broth. The cultures were diluted 20 times in 1 l pre-warmed Todd-Hewitt broth and cells were grown till optical density (600 nm) reached 0.5. The cultures were centrifuged for 20 min at 10,000 x *g*, and the pellets were washed once with an equal volume of 250 mM sucrose/25 mM Tris, pH 8.0 and once with an equal volume of superQ. The resulting pellets were dissolved in 5 ml of superQ. 1.5-ml portions of these suspensions were sonicated for 15 min using a tip sonifier (Branson sonifier 250, 50% interval, amplitude 3). Subsequently, the suspensions were treated with DNAse I and $MgCl_2$ (final concentrations of 6.5 µg/ml and 10 mM, respectively) for 10 min at 37°C. Protease inhibitors pepstatin A, leupeptin, pefabloc and aprotinin were added to final concentrations of 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 25 µg/ml and 1 µg/ml, respectively. Urea, dithiothreitol and Triton-X100 were added to a final concentration of 9M, 70mM and 2%, respectively. The samples were centrifuged for 30 min at 10,000 x *g*, the supernatants were collected and centrifuged for an additional 30min at 100,000 x *g*. The supernatants were collected and protein concentration in the samples was determined using the *RC DC* Protein Assay (BioRad) according to the manufacturer's instructions.

Two-dimensional gel electrophoresis. Samples containing 50 – 100 µg of protein were solubilized in 450 ul of sample buffer (8M urea, 2% CHAPS, 0,5% IPG-buffer 3-10, 70 mM dithiothreitol and a trace of bromo-phenol-blue). Proteins were separated in the first dimension by isoelectric focusing using Immobiline 18 cm DryStrips (3-10 NL Amershan Pharmacia Biotech) on an IPGphor (Amershan Pharmacia Biotech) after rehydration of the strips according to the manufacturer's instruction. Immediately after being focused, the strips were subsequently equilibrated for 15 min in equilibration buffer (6M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 50 mM Tris-HCL-pH 8.8, trace of bromo-phenol-blue) containing 10 mg/ml dithiothreitol and for 15 min in equilibration buffer containing 25 mg/ml of iodoacetamide. Proteins were separated in the second dimension by SDS-polyacylamide gelelectrophoresis on 12.5% pre-cast Ettan DALT gels (Amershan Pharmacia Biotech) in an Ettan DALT twelve system (Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions.

Staining. Proteins in gels were stained with silver using the PlusOne™ Silver Staining Kit (Amershan Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions or with Coomassie Brilliant blue as described by Sambrook et al. (1989) with prolonged incubation times due to the plastic backing of the gels.

Digestion of proteins from 2D gels. Protein spots identified on Coomassie stained gels were manually excised. Gel pieces were frozen in 0.1% acetic acid at –80°C until use. Proteins in the gels were digested with trypsin as described by Li et al. (2003).

Mass spectrometry of tryptically digested proteins spots from 2 D gels. A Micromass Q-TOF mass spectometer was used to analyse the masses of the tryptically digested proteins spots as described by Li et al. (2004).

Experimental infection experiments

Animals. Clinically healthy Holstein-Friesian cows, 2-4 weeks in their first lactation, were used for infection. The cows were milked twice daily at 7.00

a.m. and 4.00 p.m. All cows had somatic cell counts (SCC) below 2.0 x 10^5 cells/ml, were negative for mastitis pathogens based on repeated microbiological evaluation of milk during the last 14 days prior to infection and had no history of mastitis..

Preparation of the inoculum and inoculation. *S.uberis* strains O140J and 41-241 were used as inocula. Single colonies, grown on Columbia agar plates containing 6% horse blood (v/v) and 0.1% aesculin (w/v), were transferred into 90 ml Todd-Hewitt broth (Oxoid) and cultured overnight at 37°C. Overnight cultures were diluted 1 to 10 in the same medium and bacteria were grown to a concentration of approximately 3 x 10^8 cfu/ml (logarithmical growth phase). Cells were then collected by centrifugation and resuspended and diluted in PBS.

Two quarters of each cow were inoculated intracisternally with either 5 x 10^2 (either strain O140J or strain 41-241) or 5 x 10^3 (strain 41-241) cfu per 5 ml of PBS. Control quarters were inoculated with 5 ml of PBS. Injections were done just after the afternoon milking using disposable teat canulas. Before inoculation teats were cleaned with alcohol. The inocula were massaged upwards into the gland cisterns.

One group of four cows was challenged with 5 x 10^2 cfu of strain O140J. Another group of four cows was challenged with strain 41-241. Two of these cows were challenged with 5 x 10^2 cfu and two cows with 5 x 10^3 cfu. Cows were used in two consecutive experiments, one was finished after 45 to 80 hours and the second after 16 days.

Sampling and clinical scores. Milk samples were collected aseptically from all quarters at each milking. The samples were examined bacteriologically on blood agar plates containing 6% horse blood (v/v) and 0,1% aesculin (w/v) and the SCC was determined using standard procedures (International Dairy Federation, 1981). In addition milk samples were stored at –20°C until analysis for antibody responses. At each milking the body temperature of the cows and milk production was determined and cows were monitored for clinical

signs of mastitis (consistency of the udder and clots in the milk). Once a week blood samples were collected for analysis of antibody responses in serum.

Pathology. For histological examination mammary gland tissue from each quarter was sampled from different sites of three different horizontal cross sections, i.e. at the gland basis, halfway between basis and cisterne and at the gland cisterne. Tissue samples were fixed in 4% buffered formalin and embedded in paraffin. For histological examinations tissue sections were cut and stained with hematoxylin/eosin stain.

REFERENCES

Alber, T. 1989. Mutational effects on protein stability. Annu. Rev. Biochem. 58, 765-798.

Adv. Biochem. Eng. 43, 75-102 (1990)

Agri. Biol. Chem. 51, 51, 1587 (1987)

Appl. Environ. Microbiol. 50, 94 (1985)

Biotechnology 7, 596-603 (1989)

Bramley 1991 *Mastitis: physiology or pathology*. p. 3-9. in **Burvenich, C., G. Vandeputte-van Messom, and A.W. Hill** (ed.), *New insights into the pathogenesis of mastitis*. Rijksuniversiteit Gent, Belgium

Biseibutsugaku Kisokoza (Basic Microbiology), 1990, Vol. 8, Genetic Technology, Kyoritsu Shuppan

De Greeff et al (2002), Infect Immun. 70: 1319-1325

FEMS Microbiol. Lett. 26, 239 (1985)

Fersht, A.R. and L. Serrano, 1993. principles of protein stability derived from protein engineering experiments. Curr. Opinion Struct. Biol., 3, 75-83

Finch, J.M., A. Winter, A.W. Walton and J.A. Leigh. 1997. Further studies on the efficacy of a live vaccine against mastitis caused by *Streptococcus uberis*. Vaccine 15: 1138-43.

Fontaine, M.C., J. Perez-Casal, X.M. Song, J. Shelford, P.J. Willson, A.A. Potter. 2002. Immunisation of dairy cattle with recombinant *Streptococcus uberis* GapC or a chimeric CAMP antigen confers protection against heterologous bacterial challenge. Vaccine 20: 2278-2286.

Grandi, G. 2001. Antimicrobial vaccine design using genomics and proteomics. Trends in Microbiol. 19: 181-188.

Hill, A. W. 1988. Pathogenicity of two strains of *Streptococcus uberis* infused into lactating and non-lactating bovine mammary glands. Res Vet Sci. 45: 400-404.

Hillerton J.E., M.F. Shearn, R.M. Teverson, S. Langridge, and J.M. Booth 1993. Effect of pre-milking teat dipping on clinical mastitis on dairy farms in England. J. of Dairy Research 60: 31-41.

Hogan, J.S., K.L. Smith, K.H. Hoblet, D.A. Todhunter, P.S. Schoenberger, W.D. Hueston, D.E. Pritchard, G.L. Bowman, L.E. Heider, B.L. Brockett et al. 1989. Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. J. Dairy Sci 72: 250-258.

J. Bacteriol. 137, 614 (1979)

J. Bacteriol. 145, 382-390 (1981)

Leigh, J.A. 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis?. Vet. J. 157: 225-238.

Leigh, J. A. 2000. Vaccines against bovine mastitis due to *Streptococcus uberis* current status and future prospects. Adv. Exp. Med. Biol. 480: 307-311.

Li, K.W., M.P. Hornshaw, R.C. van der Schors, R. Watson, S. Tate, B. Casetta, C.R. Jimenez, Y. Gouwenberg, E.D. Gundelfinger, K-H. Smalla, and A.B. Smit 2004 Proteomics Analysis of Rat Brain Postsynaptic Density. J. Biol. Chem. Vol.279, 987-1002.

Matthews, B.W. 1991. Mutational analysis of protein stability. Curr. Opinion Struct. Biol., 1, 17-21.

McDougall, 1998. Efficacy of two antibiotic treatments in curing clinical and sub-clinical mastitis in lactating dairy cows. New Zealand Vet. J. 46, 226-232.

Mol. Cell. Biol. 5, 3376 (1985)

Neave F.K., F.H. Dodd, R.G. Kingwell and D.R. Westgarth. 1969. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. J Dairy Sci.52: 696-707.

Nielsen, H., S. Brunak, and G. von Heijne. 1999. Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. Protein Engineering 12: 3-9.

Oliver S.P., M.J. Lewis, B.E. Gillespie, S.J. Ivey, L.H. Coleman, R.A. Almeida, W. Fang, and K. Lamar. 1999. Evaluation of a postmilking teat

disinfectant containing a phenolic combination for the prevention of mastitis in lactating dairy cows. J. of Food Protection 62: 1354-1357.

Paton, J.C. and P. Giammarinaro . 2001. Genome-based analysis of pneumococcal virulence factors: the quest for novel vaccine antigens and drug targets. Trends in Microbiol. 9: 515-518.

Pizza M, V. Scarlato, V. Masignani, M.M. Giuliani, B. Arico, M. Comanducci, G.T. Jennings, L. Baldi, E. Bartolini, B. Capecchi, C.L. Galeotti, E. Luzzi, R. Manetti, E. Marchetti, M. Mora, S. Nuti, G. Ratti, L. Santini, S. Savino, M. Scarselli, E. Storni, P. Zuo, M. Broeker, E. Hundt, B. Knapp, E. Blair, T. Mason, H. Tettelin, D.W. Hood, A.C. Jeffries, N.J. Saunders, D.M. Granoff, J.C. Venter, E.R. Moxon, G. Grandi and R. Rappuoli. 2000. Identification of vaccine candidates against serotype B Meningococcus by whole-genome sequencing. Science 287: 1816-1820.

Rappuoli, R. 2000. Reverse vaccinology. Current Opinion in Microbiol. 3: 445-450.

Wizemann T.M., J.H. Heinrichs, J.E. Adamou, A.L. Erwin, C. Kunsch, G.H. Choi, S.C. Barash, C.A. Rosen, H.R. Masure, E. Tuomanen, A. Gayle, Y.A. Brewah, W. Walsh, P. Barren, R. Lathigra, M. Hanson, S. Langermann, S. Johnson and S. Koenig. 2001. Use of whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. Infect. Immun. 69: 1593-1598.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Schalm et al. (1971) *The mastitis complex-A brief summary.* p. 1-3. In Bovine Mastitis. Lea & Febiger, Philadelphia.

Trends in Biotechnology 7, 283-287 (1989)

Van der Burg, S.H., W.M. Kast, R.E.M. Toes, R. Offringa, C.J.M. Melief, Methods for selecting and producing T cell peptide epitopes and vaccines

incorporating said selected epitopes. International Patent Application WO 97/41440.

Vriend, G. and V.G.H. Eijsink, 1993. Prediction and analysis of structure, stability and unfolding of bacillus neutral proteases. J. Computer-Aided Mol. Design 7, 367-396.

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

Yeast 8, 423-488 (1992).

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

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

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

TABLE 1. Surface proteins of *S.uberis* containing a LPxTGE sortase motif

Protein	contig. nr.	aa (nr.)	Data base homology (accession no.)	% Identity	predicted sorting signal
P11	231c11	1270	*S. mutans* Exo-beta-D-fructosidase (U78296)	54	LPMTSD SNNNLEELGILVILTTLGAFLGRVILKKEK
P12	S00737	317	*S. agalactiae* hypothetical protein unknown (Q8CM32)	60	LPNTGE SSIAPFTAIGAIILSVLGLLGFKKRRTY
P13	129h4	484	*S. pyogenes* collagen like protein (AY069936)	45	LPSTGD KANPFFTAAALAVMASAGMVAVSRKRKED
P14	K00518	565	*S. pyogenes* collagen like protein (AF336814)	44	LPSTGD KANPFFTAAALAVMASAGMVAVSRKRKED
P15	130g06	693	*S. pyogenes* 5'-nucleotidase (NC_004070)	46	LPTTSS QEDTAILLSLLGASSLAMAVALKKKENN
P16	223b05	268	no homology	--	LPSTGE DYQAYLVAAAMALIASSGMVAYGSYRKKKQK
P17	52g05	1074	*Bacillus halodurans* unknown (NC_002570)	34	LPALAD GSHKDDSKLFWVTGLLVASGGLFAALKRREED
P18	240d11	499	*S. aureus* fibrinogen-binding protein homolog (AJ005646)	26	LPMAGE RGSRLFTFIGLSLILGIAGYLLKHKKVKS
P19	32a09	278	*S. pneumoniae* beta-N-acetyl-hexosaminidase precursor (NC_003098)	32	LPPTGS QESGIFSLFSALISTALGLFLLKSNKND
P20	122b06	506	*S.uberis* lactoferrin binding protein (AAQ83577.1)	42	LPSTGD KPVNPLLVASGLSLMIGAGAFVYAGKRKKG
P22	130g06	1483	*S. pneumoniae* serine proteinase precursor PrtA (AF127143)	25	LPETRD SSSMANWSLAFFLSAVICFFKGRRKRLNKL

P23	S03520	456	no hits	--	LPTTGD KADGSIVQMVIGALMVSFVGFSALKDRKKEK
P24	S00737	238	*S. agalactiae* hypothetical protein unknown (Q8CH3)	46	LPHTGE EKGFLSIIGGTILSFVAFLFKKKITLN
P25	S00737	876	*S. agalactiae* hypothetical protein unknown (Q8CMF2)	49	LPHTGE EGLSILTVIGASILSVLGLSVLKKPKEN
P26	224g12	649	*Schizosaccharomyces pombe* hypothetical protein (NC_003421)	22	LPTTGD DQNLLVTLMSSLLLMSLGLGLKKKEDE
P27	113f05	1144	*S. pyogenes* C5a peptidase (NC_004070)	34	LPKTDS QKTMTFLGIAMLFGGILQVLWSYFKKRD
P115	69h12	818	S. suis cyclo-nucleotide phosphodiesterase (AB066354)	64	LPKAGS QESKGLFFMGLSLLGLAGLITKKEERQ

TABLE 2. Putative lipoproteins of *S.uberis*

Protein	contig. nr.	aa (nr.)	Data base homology (accession no.)	% Identity	predicted sorting signal
P30	198g02	293	*S.pneumoniae* phosphate binding protein (AAL00697.1)	71	MKIMKMNKMLTLAVLTLSSFGLAAC
P31	111h03	451	*S.pneumoniae* sugar binding protein (AAK75762.1)	24	MSKKILKLATLAILPFVGLTAC
P32	32a09	309	*S. pyogenes* laminin adhesion (AAL98544.1)	62	MKRKFLSFILVLTFFLPFLVGLSAC
P33	71g04	314	*S. pyogenes* protease maturation protein (AAK34209.1)	61	MNTSKKIVTGFVTLASVLTLAAC
P34	113f05	416	*S. pyogenes* maltose/maltodextrin-binding protein (AAL97920.1)	85	MKSWQKIIVSGASLTLASTLLVGC
P35	121e03	212	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAK34138.1)	57	MIGLLMKTQKSITLLLLSVLC
P36	121e03	277	*S.uberis* amino acid binding protein (AF086736)	97	MNLKKILLTTLALASTLFLVAC
P37	108f04	351	*S. pyogenes* putative lipoprotein (AAK34087.1)	78	MNKKFIGLGLASVAILSLAAC
P38	108f04	285	*S. pyogenes* phosphate binding protein (AAK34100.1|)	80	MKKFFLVGMLTLSMLTLTAC
P39	45f07	282	*B. subtilis* amino acid binding protein (CAB12132.1)	49	MKKLFIYLSLAFSLLVLGAC

P40	198g02	310	*S. pyogenes* metal binding protein (AAL97215.1)	79	MKKKLSLAIMAFLGLLMLGAC
P41	130c11	311	*S. pyogenes* ferrichrome binding protein (AAL97215.1)	70	MKKLLVTLVLIFSTLSLIAC
P42	130c11	307	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAK33400.1)	70	MKIKLNRILFSGLALSILITLTGC
P43	130c11	281	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAL97072.1)	76	MSYKKILGLIGLTLVSSVLVAC
P44	130c11	274	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAL97071.1)	66	MTLKKNLGILSLTLGTLAILAAC
P45	240d11	434	*S. mutans* sugar-binding protein (AAN59568)	52	MIKFETKKGQKLFLFGLILCFC
P46	141f06	272	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAK33324.1|)	67	MKVKKNIKIAALLPMLTLLAAC
P47	125g06	539	*S. pneumoniae* substrate-binding protein (AAK75869.1)	76	MKKRWIASSVIVLASTIVLGAC
P49	122b05	347	*S. pyogenes* putative ABC transporter (AAM78733.1)	65	MNKKLTSLALLSAAIIPLAAC
P50	161c09	552	*S. equi* hyaluronate-associated protein (AF100456)	79	MTVAQKSTFKRFGLGAVTLASAALLMAC
P51	198b02	268	*S. pyogenes* substrate-binding protein (AAL97497.1)	52	MKTKKILKAAIGLMTLVSMTAC
P52	198g02	270	*S. pyogenes* peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (AAM78928.1)	67	MKKIISFALLTLSLFSLSAC
P53	231c11	173	*Methanosarcina acetivorans* hypothetical protein (AAM03977.1)	29	MKKTFTSTLVLLSALMLTAC

P54	53f09	286	*S.uberis* streptokinase (AJ131604)	100	MKKWFLILMLLGIFGC
P55	68d07	127	*S. pyogenes* hypothetical protein (AE014145)	61	MGNYFKSLCLLLFSFLLVAC
P56	69h12	357	no homology	--	MSKIVKKIFFLTAFLIMFFLSAC
P57	87h02	390	*S. pneumoniae* branched-chain amino acid binding protein (AE007382)	46	MKKKLLVSTTACLSLLSLAAC
P58	69h12	221	*Clostridium acetobutylicum* cell wall-associated hydrolases (AE007516)	44	MINKKIIFTSLTVICISNC
P112	231c11	320	*S. agalactiae* putative lipoprotein (NP_689064)	45	MKKGMRFSLILLALMLLTAC
P113	52g05	322	L. lactis ribose binding protein (NP_689064.1)	59	MKCIKKLGFLALFLSMLLLLGAC
P117	198g02	291	*S. pneumoniae* phosphate binding protein (AE007497)	72	MKMNKMLTLAVLTLSSFGLAAC

TABLE 3. Selected putative surface proteins/virulence factors of *S.uberis*

Protein	contig. nr.	aa (nr.)	Data base homology (accession no.)	% Identity	predicted cleavable signal sequence
P2	130c11	183	*S.pyogenes* cytoplasmic membrane protein (AAK33386.1)	80	-
P3	130c11	297	*S.pyogenes* heat shock protein	66	MLYQQIAQNKRKTIFLILAFFFLLTAIGA (AE014141)
P4	198g02	452	*S. pyogenes* sensor histidine kinase (AE014144)	82	-
P5	67h05	362	*S. pyogenes* choline binding protein (AE006476)	52	MKFIKILLSQIVSLFLLLTISLHALETVNA
P6	113f05	416	*S. pneumoniae* DNA entry nuclease (NP_346391.1)	60	MSNKYPSGKKISAILIALLITGLTALSQG
P7	231c11	300	*S.pyogenes* ABC transporter (AAL96916.1)	47	-
P9	231c11	146	*S. pyogenes* competence protein (AE014138)	40	MKISCCHSKAFTLAESLLCLAVTTFTILLLSSSLAGV
P21	80b12	246	*S. pyogenes* acyltransferase (AAM79682.1)	77	-
P28	130g06	246	*S. pyogenes* peptidoglycan hydrolase (AE006536|)	60	MRFLKGKKVFLAVIGLAVMMTLVIMFQPQAKN
P29	224g12	550	*S. pyogenes* hypothetical protein	46	MKKIFQRKWFKRTSIVLGILLVALIALG (AAK34725.1)
P59	111h03	174	*Corynebacterium jeikeium* YpkK	43	MKKKFLKIMTCIIAICSIFPYLSSMASTVYA (AF486522_8)

P60	113b07	248	*S. pyogenes* D,D-carboxypeptidase (AAM80142.1)	70	MMKNNKLLSFLFQLLVILLFIFCLFYYIKA
P61	130c11	195	*S. pyogenes* N-acetyl-muramidase (AAL98352.1)	45	MRNRLTFSYFIGIFLTFLFLLITPLIVNSQA
P62	130c11	421	*S. pyogenes* protein DltD	67	MLRKLLTIVGPVFLALLLVLVTIFS (AAM79598.1)
P63	114a06	878	*S. pyogenes* surface exclusion protein (AAK33344.1)	36	MEFENTKSNQIKTTLALTSTLALLGTGVGMGHTVNA
P64	115e06	428	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAK33154.1|)	57	MKKLLACMLMVFFLSPISVISTEKSIS
P65	115e06	400	*S. pyogenes* serine protease (AAK34840.1|)	71	MPVSKFKHFFKYIMIVGLGFIGGALAFFVMNLLPHPSST
P66	115e06	656	*S .pyogenes* hypothetical protein (AAM80444.1)	71	MKKFRFETIHLVMMGLILFGLLALCVRIMQSKMLIILA
P67	115e06	302	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAK34806.1)	22	MKTWKKTILITSLCLLISGAALAGFGFIRGGWS
P68	115e06	216	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAK34820.1)	41	MIRKENFKKRYISFGILGFAVALLALVFAF
P69	121e03	185	*S. pyogenes* signal peptidase I (AAM79518.1)	54	MVKRDFIRNIILALLAIVIFILLRIFVFS
P70	129h04	318	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAM79277.1)	73	MKSFFNSRIWLGLVSVFFAIVLFLTA
P71	130c11	535	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAK34403.1|)	77	-
P72	130c11	739	*S. pyogenes* penicillin binding protein *1A* (AAL98205.1)	80	-

P73	130g06	307	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAL97680.1|)	68	MRRQKKQQKKIIPLFLILLFSTLLLFTGFLFKKELRA
P74	130g06	317	*S. pneumoniae* hypothetical protein (AAK99735.1)	61	MFKKKLMLTGLILFSGMTVSTASA
P75	133f06	241	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAM80084.1|)	29	MKPSNTEKLFLILSLLTLILAGSFYLFFARNHIGNA
P76	141f06	212	no significant hits	--	MKKIQKIFIALSTMILLLSNIFSTIIYA
P77	141f06	304	*S.uberis* UDP-glucose pyrophosphorylase (AJ400707)	100	MTKVRKAIIPAAGLGTRFLPATKALA
P78	141g05	386	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAK34063.1)	48	-
P79	149b09	304	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAL97494.1)	63	-
P80	153a02	1058	*S. pneumoniae* carbamoyl-phosphate synthase (Q97QE4)	75	-
P81	153f08	518	*S. pyogenes* adhesion protein (AAL97448.1)	69	MKKKTLVMMGLAGLVAGGQLYQAKAVLA
P82	198g02	441	*S. pneumoniae* histidine kinase (AAL00696)	57	-
P83	198g02	288	*S. thermophilus* Peb1 (AF327739)	61	MKKFKPRKKSDIKRRIAMNQFKKWTFFCLMTLLTLIFMPKASA
P84	198g02	126	no significant hits	--	MLLRKARHSLKRRHMMLEVLLIVSTFFLFIIFISLLIGIKRRS
P85	224g12	774	*S. pyogenes* penicillin binding protein 2A (AAL98575.1)	77	-

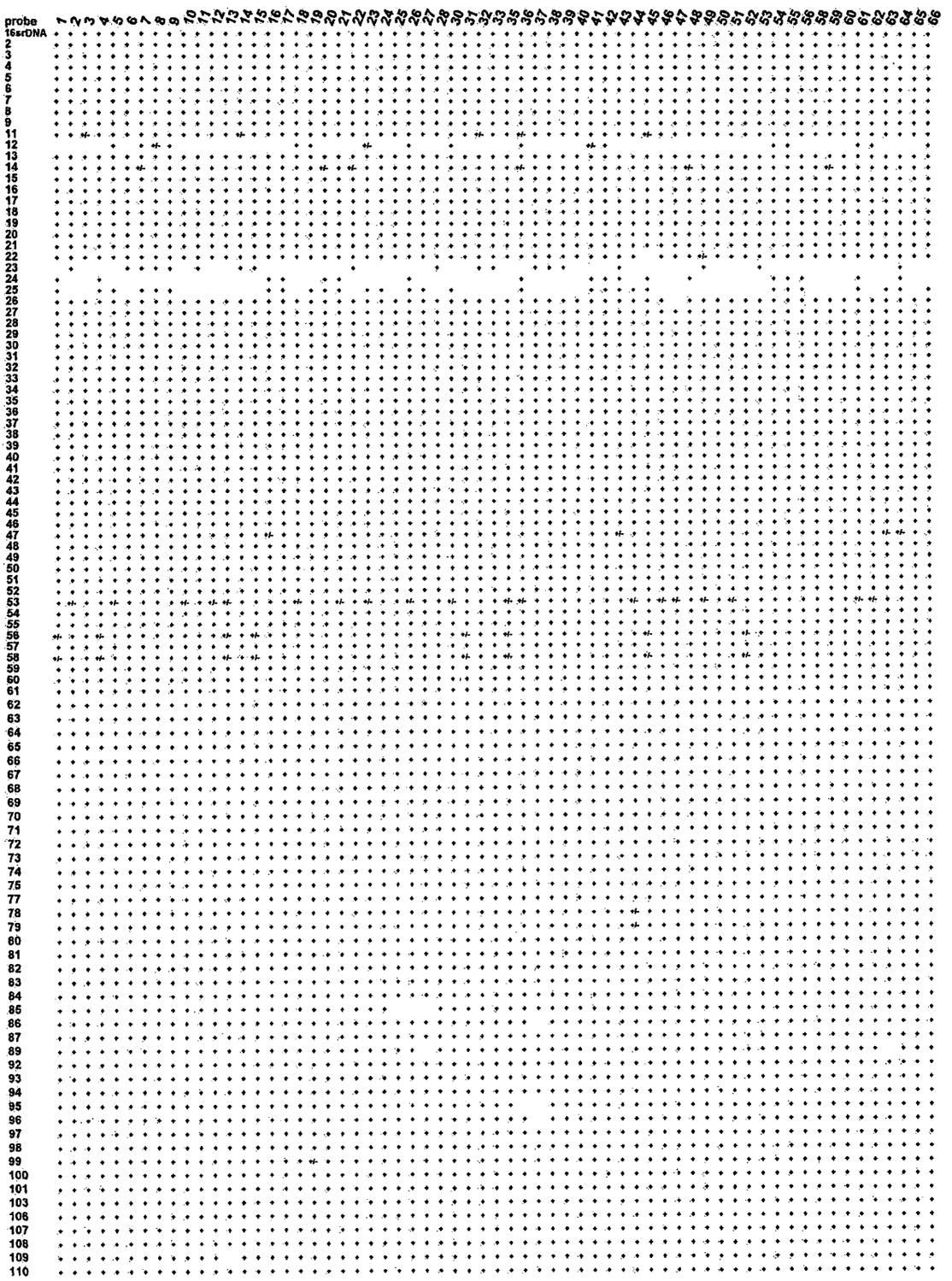
P86	224g12	498	*S. pyogenes* dipeptidase (AAM80370.1)	80	MNTKKFTLATVTVMTALACYSSA
P87	224g12	386	no significant hits	--	MFKTKKEIFSIRKTALGVGSVLLGVILTTQVASA
P88	231c11	119	*S. pyogenes* hypothetical protein (AE009962)	37	-
P89	231c11	772	*S. pyogenes* penicillin binding protein 1B (AAK33215.1)	77	-
P90	238b05	331	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAL97637.1)	63	-
P91	238b05	550	*S. pyogenes* fibronectin-binding protein-like protein A (AAK33911.1)	80	-
P92	240d11	200	no significant hits	--	MANYKKITSLSLLTLLSLATFSATQYSKVYA
P93	31e02	758	*Bacillus halodurans* N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (BAB07384.1)	32	MKSKKSYVLLLAPFVLASFWQSKMVSA
P94	38f04	143	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAK34637.1)	27	MKKRKNKWRFFMIKMRKSQLSVSLALFALLTFAASPIYA
P95	40c10	747	*S. pyogenes* penicillin binding protein 2X (AAK34426.1)	74	-
P96	45f07	200	*S. suis* Cps9F (AAF18949)	77	MYQVVKRLLAILISGLAIIILSPVLLAVAIA
P97	45f07	424	*S. agalactiae* CpsA (AF349539)	61	MASLLLILLKKAKLLTMIGLILANIGLAVTLFA
P98	52g05	347	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAK34330.1)	68	MKVIKTYKWWVLSILSMVLILFALFFPLPYYIEMPGGA

P99	52g05	506	*B. anthracis* amidase (NP_655785)	40	-
P100	53f09	169	*L. lactis* unknown protein (AAK04688.1)	50	-
P101	67h05	425	*S. mutans* immunodominant glycoprotein (AAK94501.1)	41	MKKRILSAVLVSGVTLGTATTVNA
P102	67h05	137	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAL96870.1)	57	-
P103	68d07	280	*S. pyogenes* endolysin (AAL97346.1)	73	MRRRIKPIVVLVFFLLFALLLIIGKTHS
P104	71g04	429	*S. pyogenes* putative peptidoglycan GlcNAc deacetylase (AAM79651.1)	47	MKKFYVIVGTLLSIFILSVSLFVYS
P105	71g04	727	*S. pyogenes* internalin A (AAL97968.1)	52	MKKKTYLFVAGITVTCGTAL
P106	77f12	393	*S. pyogenes* D D carboxypeptidase (AAM78820.1)	62	MIKKILLFLSIFALTISTIPVIA
P107	77f12	400	*S. pyogenes* D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (AAM78821.1)	38	MKKTILSTIIVGLFLWTLSTLVLA
P108	77f12	415	*S. pyogenes* D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (AAM78821.1)	60	MKKMLLLCFIFLILFPINFVNA
P109	80b12	202	*S. pyogenes* superoxide dismutase [Mn] (AAM79678.1)	89	-
P110	80b12	350	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAL98000.1)	71	MRLQMMTFLRKINSTKVLIFLCVSLFLGLVVTVSA
P111	198g02	128	*S. pneumoniae* hypothetical protein (AAL00353.1)	36	MKRKISLFLFLASIFATTNSVFA

P116	84d07	427	*S. pyogenes* RopA (AAM80241.1)	82	-
P118	108f04	115	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAL97738.1)	34	MKAKRDGLIIGLVTGVVAGTLSYLSLSHS
P119	113f05	301	*S. pyogenes* tRNA isopentenylpyrophosphate transferase (AAL97618.1)	68	MTKKEKIIVIVGPTAVGKTALGIQVAQA
P120	115e06	216	*Bacillus halodurans* hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (BAB05714.1)	52	MTNIKTIGVVGAGAMGGGIANLFA
P121	115e06	287	*B. halodurans* 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (BAB05714.1)	43	MTNIKTIGVVGAGAMGGGIANLFA
P122	130c11	589	*S. pyogenes* aminodeoxychorismate lyase (AAL97146.1)	52	-
P123	130g06	331	*S. pyogenes* thioredoxin reductase (AAM79182.1)	80	-
P124	130g06	203	*S. pyogenes* peptidoglycan hydrolase (AAK33784.1)	68	-
P125	130g06	246	*S. pyogenes* peptidoglycan hydrolase (AAK33785.1)	61	MRFLKGKKVFLAVIGLAVMMTLVIMFQPQAKNKSVSAE
P126	130g06	357	*S. pyogenes* spermidine/putrescine ABC transporter (AAK33983.1)	80	MRRLYSFIAGVLGIILILASSTFILQKKTGSA
P127	130g06	200	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAL97729.1)	74	-
P128	133f06	609	*S. pyogenes* alpha-glycerophosphate oxidase (AAK34439.1)	80	-
P129	198g02	337	*Listeria monocytogenes* autolysin (AF035424)	38	-

P130	19e05	289	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAM79683.1)	78	-
P131	224g12	545	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAK34725.1)	46	MKKIFQRKWFKRTSIVLGILLVALIALGS
P132	240d11	308	*L. lactis* unknown protein (AAK06265.1)	29	MKSNDPLALLAKKRRRKTFLMTIVFSLLATLLLFALCFKLLS
P133	240d11	322	*Clostridium acetobutylicum* Ribose ABC transporter (AAK79421.1)	39	-
P134	24d11	485	*Staphylococcus aureus* hypothetical protein (BAB95577.1)	29	MLSYRVVKRRLGMVKKQVAIIGMGVSGLAVLLALS
P135	241b08	195	*S. pyogenes* hypothetical protein (AAK34290.1)	58	MRKKRTINWWKWSFLILLALNLAFVCVIA
P136	45f07	347	*Chlorobium tepidum* glycosyl transferase (AAM71444.1)	31	-
P137	52g02	393	*Streptococcus pyogenes* cell division protein (AAK34317.1)	43	-
P138	68d07	280	*S. pyogenes* endolysin (AAL97346.)	73	MRRRIKPIVVLVFFLLFALLLIIGKTHSD
P139	7f09	197	*S. pyogenes* signal peptidase I (AAK34563.1|)	69	MKHFFKEWGLFTLVILIFGISRLFFWQPVKVDG

Table 4 Strain



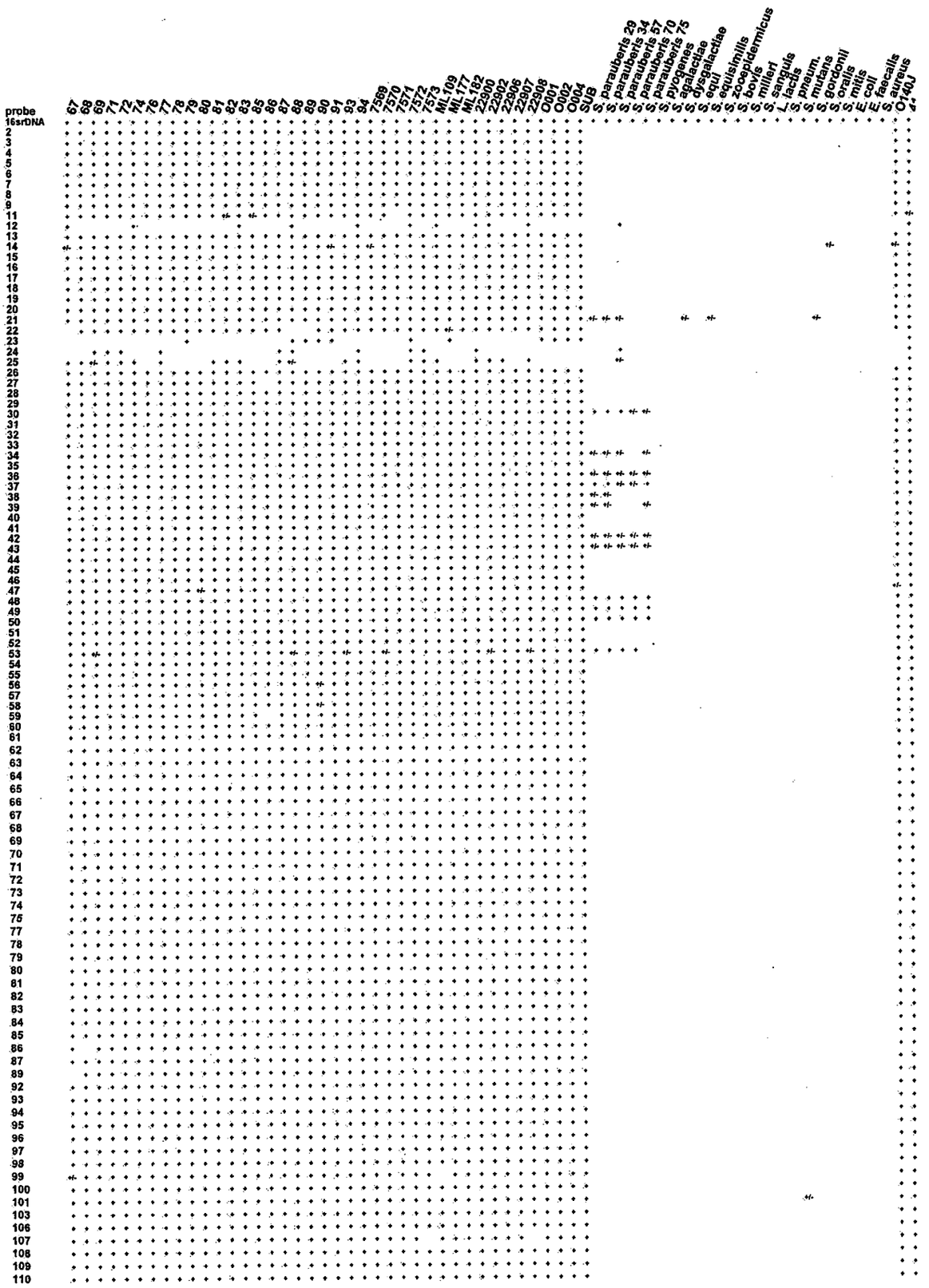
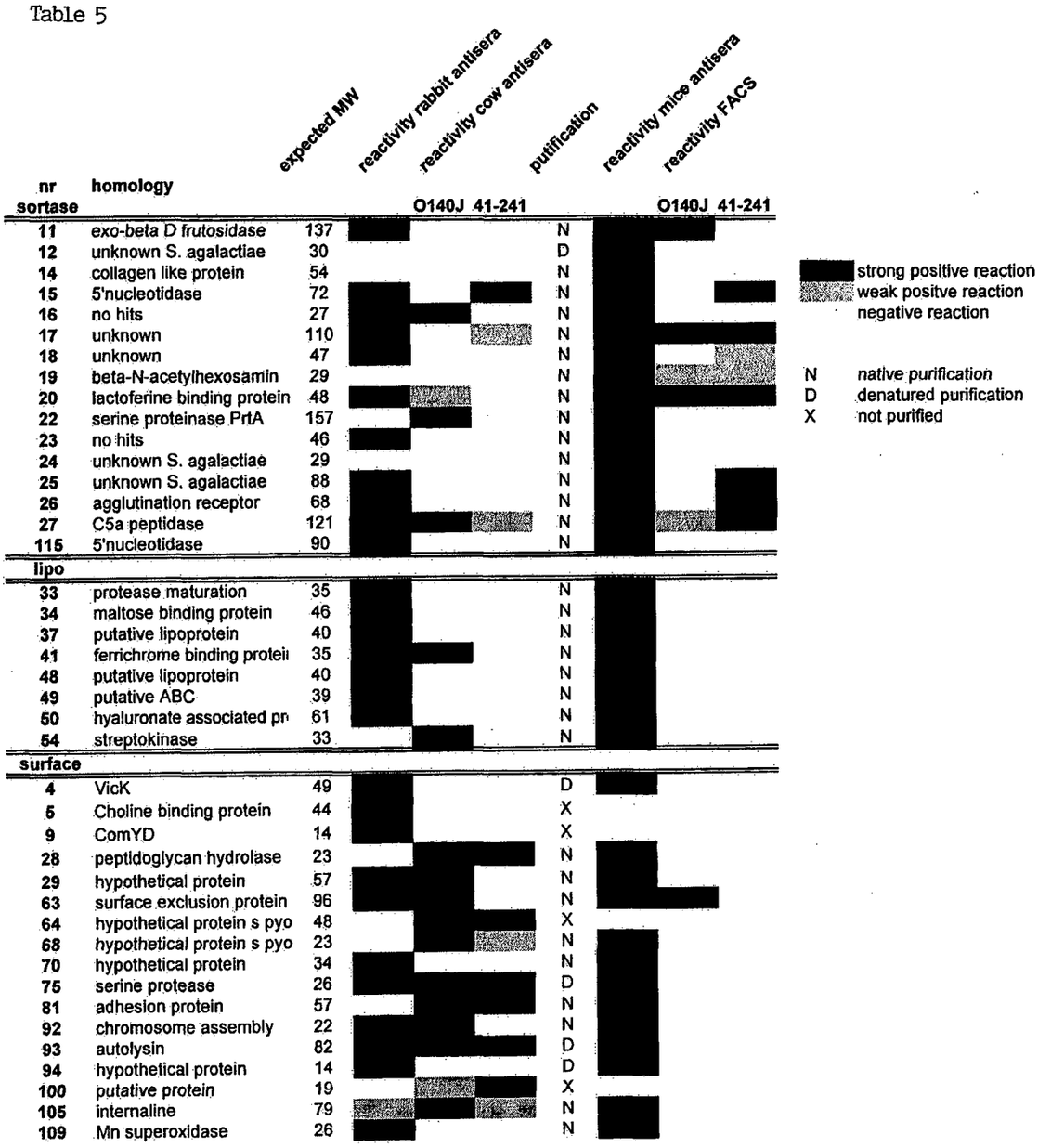

probe
16srDNA
67
68
69
71
72
74
76
77
78
79
80
81
82
83
85
86
87
88
89
90
91
93
94
7569
7570
7571
7572
7573
ML109
ML177
ML182
22900
22902
22906
22907
22908
O001
O002
O004
SU9
S. parauberis 29
S. parauberis 34
S. parauberis 57
S. parauberis 70
S. parauberis 75
S. pyogenes
S. agalactiae
S. dysgalactiae
S. equi
S. equisimilis
S. zooepidermicus
S. bovis
S. milleri
S. sanguis
L. lactis
S. pneum.
S. mutans
S. gordonii
S. oralis
S. mitis
E. coli
E. faecalis
S. aureus
O140J
4,

Table 5



nr	homology			
sortase				
11	exo-beta D frutosidase	137	N	
12	unknown S. agalactiae	30	D	
14	collagen like protein	54	N	
15	5'nucleotidase	72	N	
16	no hits	27	N	
17	unknown	110	N	
18	unknown	47	N	
19	beta-N-acetylhexosamin	29	N	
20	lactoferine binding protein	48	N	
22	serine proteinase PrtA	157	N	
23	no hits	46	N	
24	unknown S. agalactiae	29	N	
25	unknown S. agalactiae	88	N	
26	agglutination receptor	68	N	
27	C5a peptidase	121	N	
115	5'nucleotidase	90	N	
lipo				
33	protease maturation	35	N	
34	maltose binding protein	46	N	
37	putative lipoprotein	40	N	
41	ferrichrome binding protei	35	N	
48	putative lipoprotein	40	N	
49	putative ABC	39	N	
50	hyaluronate associated pr	61	N	
54	streptokinase	33	N	
surface				
4	VicK	49	D	
5	Choline binding protein	44	X	
9	ComYD	14	X	
28	peptidoglycan hydrolase	23	N	
29	hypothetical protein	57	N	
63	surface exclusion protein	96	N	
64	hypothetical protein s pyo	48	X	
68	hypothetical protein s pyo	23	N	
70	hypothetical protein	34	N	
75	serine protease	26	D	
81	adhesion protein	57	N	
92	chromosome assembly	22	N	
93	autolysin	82	D	
94	hypothetical protein	14	D	
100	putative protein	19	X	
105	internaline	79	N	
109	Mn superoxidase	26	N	

TABLE 6. Immunogenic proteins of *S.uberis* identified on 2D gels and characterized by mass spectrometry.

spotnr.	protein name	mass (kDa)	pI
1	surface exclusion protein	94,8	5,8
2	trigger factor (ropA)	47,3	4,3
3	nucleoside diphosphate kinase	16,2	5,7

TABLE 7. Summary of the results of experimental intra-mammary infections by *S.uberis* strains O140J and 41-241

cow no.	strain	experiment finished after	inoculation dose (cfu)	max. SCC	SCC prior to inoculation	max. temp	no quarters successfully infected	BO max. score[1)]	clots in milk max. score[2)]	consistency udder max. score[3)]
6716	O140J	50 hours	5×10^2	$2{,}9 \times 10^7$	$2{,}7 \times 10^4$	40,2	2	3	0	0
6717	O140J	80 hours	5×10^2	$9{,}7 \times 10^5$	$1{,}2 \times 10^5$	38,6	1	1	0	0
6720	41-241	45 hours	5×10^3	$2{,}8 \times 10^7$	$4{,}8 \times 10^4$	40,8	2	3	2	0
6721	41-241	67 hours	5×10^2	$7{,}2 \times 10^6$	0.9×10^5	38,7	2	3	1	0
6718	O140J	16 days	5×10^2	$2{,}9 \times 10^7$	0.9×10^5	40,9	2	3	4	3
6719	O140J	16 days	5×10^2	$2{,}4 \times 10^7$	0.9×10^5	40,0	1	3	3	3
6722	41-241	16 days	5×10^3	$2{,}7 \times 10^7$	$4{,}4 \times 10^4$	41.0	2	3	3	2
6723	41-241	16 days	5×10^2	$2{,}1 \times 10^7$	$3{,}6 \times 10^4$	39,5	2	3	2	1

[1)] BO score: BO negative: 0; $< 10^3$ cfu/ml milk: 1; $> 10^3 < 10^5$ cfu/ml milk: 2: $> 10^5$ cfu/ml milk: 3
[2)] normal milk: 0; few clots: 1; numerous clots: 2; milk with pus: 3; milk with blood: 4.
[3)] consistency score: normal consistency: 0; mild changes: 1; moderate changes: 2; severe changes: 3.

Claims

1. A method for identifying a *Streptococcus* protein which is capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus*, the method comprising:
a) identifying at least part of a secreted protein, a surface-associated protein and/or a protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor;
b) selecting at least one protein identified in step a) which is conserved over at least two *Streptococcus* strains and/or serotypes; and
c) determining whether at least one protein selected in step b) or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof is capable of specifically binding an antibody and/or immune cell of an animal infected by a first *Streptococcus* strain and/or serotype, and an antibody and/or immune cell of an animal infected by a second *Streptococcus* strain and/or serotype.
2. A method according to claim 1, wherein said secreted protein and/or surface-associated protein is identified by identifying in at least part of the genomic sequence of *Streptococcus* a gene comprising a motif of a secreted and/or surface-associated protein.
3. A method according to claim 1 or 2, wherein said protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor is identified by identifying in at least part of the genomic sequence of *Streptococcus* a gene which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor gene.
4. A method according to claim 1 or 2 or 3, wherein said protein which has at least 50% sequence identity to a bacterial virulence factor is identified by identifying in at least part of the genomic sequence of *Streptococcus* a gene which hybridizes to the full length nucleotide sequence of any of the

nucleic acid sequences listed in Figure 4 at 65°C in a buffer having 0.5 M sodium phosphate, 1 mM EDTA, and 7% sodium dodecyl sulphate at a pH of 7.2,

wherein the nucleic acid molecule remains hybridized after

washing twice with a buffer containing 40 mM sodium phosphate (pH 7.2), 1 mM EDTA and 5% sodium dodecyl sulphate for 30 minutes at 65°C and;

washing twice with a buffer containing 40 mM sodium phosphate (pH 7.2), 1 mM EDTA and 1% sodium dodecyl sulphate for 30 minutes at 65°C.

5. A method according to claim 2, 3 or 4, further comprising selecting a gene which is conserved over at least two *Streptococcus* strains and/or serotypes.
6. A method according to claim 5, further comprising obtaining a protein encoded by said gene, or an immunogenic part, derivative and/or analogue of said protein.
7. A method according to any one of claims 2-6, wherein said gene is expressed in a prokaryotic expression system.
8. A method according to any one of claims 1-7, comprising:
- obtaining isolated and/or recombinant proteins of *Streptococcus*;
- incubating said proteins with an antibody and/or immune cell of an animal infected by a first *Streptococcus* strain and/or serotype and an antibody and/or immune cell of an animal infected by a second *Streptococcus* strain and/or serotype, and
- determining whether a protein is capable of binding an antibody and/or immune cell of an animal infected by a first *Streptococcus* strain and/or serotype and an antibody and/or immune cell of an animal infected by a second *Streptococcus* strain and/or serotype.
9. A method according to claim 8, further comprising expressing said protein using a nucleic acid sequence encoding said protein.
10. A method according to any one of claims 1-9, wherein said antibody and/or immune cell is derived from a convalescent serum.

11. A method according to any one of claims 1-10, wherein said *Streptococcus* protein is capable of eliciting opsonophagocytosis inducing antibodies.
12. A method according to any one of claims 1-11, wherein at least two *Streptococcus* proteins capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus* are identified.
13. A method for producing at least one protein identified by a method according to any one of claims 1-12.
14. A method according to any one of claims 1-13, wherein said *Streptococcus* is *Streptococcus uberis*.
15. A *Streptococcus* protein which is capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus* obtainable by a method according to any one of claims 1-14.
16. Use of a protein obtainable by a method according to any one of claims 1-14, or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof, for the preparation of an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus*.
17. Use according to claim 16, wherein said protein is selected from Table 5 and/or Table 6.
18. An immunogenic composition capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus* comprising at least one isolated and/or recombinant protein obtainable by a method according to any one of claims 1-14, or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof.
19. An immunogenic composition according to claim 18 comprising at least two isolated and/or recombinant proteins, and/or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof, obtainable by a method according to any one of claims 1-12.
20. An immunogenic composition capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus* comprising at least one nucleic acid molecule encoding at least one protein obtainable by

a method according to any one of claims 1-12, or an immunogenic part, derivative and/or analogue of said protein.

21. An immunogenic composition according to any one of claims 18-20, wherein said *Streptococcus* is *Streptococcus uberis*.

22. An immunogenic composition according to any one of claims 18-20, wherein at least one, preferably at least two of said proteins is selected from Table 5 and/or Table 6.

23. A method for producing an immunogenic composition capable of eliciting an immune response against at least two strains and/or serotypes of *Streptococcus*, said method comprising providing a cell with at least one recombinant vector, said at least one vector comprising a nucleic acid sequence encoding at least one protein obtainable by a method according to any one of claims 1-14 and/or at least one protein selected from Table 5 and/or Table 6, and/or an immunogenic part, derivative and/or analogue thereof.

24. A recombinant nucleic acid molecule comprising a nucleic acid sequence encoding at least two proteins obtainable by a method according to any one of claims 1-14 and/or at least two proteins selected from Table 5 and/or Table 6, and/or an immunogenic part of at least one of said proteins, under the control of a functionally linked promoter.

25. A recombinant carrier comprising a nucleic acid encoding at least two proteins obtainable by a method according to any one of claims 1-14 and/or selected from Table 5 and/or Table 6, and/or an immunogenic part of at least one of said proteins, or a recombinant nucleic acid molecule according to claim 24.

26. A recombinant carrier according to claim 25 which is a live carrier.

27. A recombinant carrier according to claim 25 or 26, which is a *Streptococcus* species.

28. A recombinant carrier according to claim 27, wherein said streptococcus species is a *Streptococcus uberis*.

29. A recombinant carrier according to claim 27 or 28, wherein said *Streptococcus* is lacking at least part of a capsular gene expression product.
30. A recombinant carrier according to any one of claims 27-29, wherein said *Streptococcus* is a non-capsular streptococcus.
31. A recombinant carrier according to any one of claims 25-30, comprising a nucleic acid encoding at least one protein and/or immunogenic part thereof derived from a first *Streptococcus* strain and/or serotype, and a nucleic acid encoding at least one protein and/or immunogenic part thereof derived from a second *Streptococcus* strain and/or serotype.
32. An isolated host cell comprising a nucleic acid sequence encoding at least two proteins obtainable by a method according to any one of claims 1-14 and/or selected from Table 5 and/or Table 6, and/or an immunogenic part of at least one of said proteins, or a recombinant nucleic acid molecule according to claim 24 or a recombinant carrier according to any one of claims 25-31.
33. An immunogenic composition capable of eliciting an immune response against *Streptococcus,* said composition comprising a recombinant carrier according to any one of claims 25-31.
34. An immunogenic composition according to any of claims 18-22 and/or 33 for use as a medicament.
35. Use of an immunogenic composition according to any one of claims 18-22 and/or 33 for the preparation of a medicament against *Streptococcus uberis* mastitis.
36. Use of an immunogenic composition according to any one of claims 18-22 and/or 33 for the preparation of a vaccine.
37. A method for decreasing and/or controlling the number of *Streptococcus* organisms in an individual and/or non-human animal comprising providing said individual and/or non-human animal with an immunogenic composition according to any one of claims 18-22 and/or 33.

38. A pharmaceutical composition comprising an immunogenic composition according to any one of claims 18-22 and/or 33 and a suitable carrier, diluent and/or excipient.

39. A method for measuring the immunity of an individual and/or non-human animal against *Streptococcus*, said method comprising determining in at least one sample from said individual and/or animal the presence of antibodies directed against a protein obtainable by a method according to any one of claims 1-14 and/or selected from Table 5 and/or Table 6, or an immunogenic part thereof.

40. A diagnostic kit comprising at least one protein obtainable by a method according to any one of claims 1-14 and/or selected from Table 5 and/or Table 6, or an immunogenic part thereof, and a means of detecting antibody binding to said protein or immunogenic part thereof.

41. An immunogenic composition capable of eliciting an immune response against *Streptococcus uberis* comprising at least two recombinant and/or isolated surface proteins derived from at least one *Streptococcus uberis* strain, and/or an immunogenic part or analogue or derivative of either or both of said proteins.

42. An immunogenic composition according to claim 41, wherein said at least two proteins are selected from Table 5 and/or Table 6.

43. A method for producing an immunogenic composition according to claim 41 or 42, said method comprising providing a cell with a recombinant vector, said vector comprising a nucleic acid encoding at least two proteins as listed in Table 5 and/or Table 6, and/or an immunogenic part or analogue or derivative of either or both of said proteins.

44. A method according to claim 43, comprising providing at least two cells with a recombinant vector according to claim 43 and/or a recombinant vector comprising a nucleic acid encoding a protein as listed in Table 5 and/or Table 6, and/or an immunogenic part or analogue or derivative of either or both of said proteins.

45. A recombinant molecule comprising a nucleic acid sequence encoding a protein as listed in Table 5 and/or Table 6, and/or an immunogenic part or analogue or derivative thereof under the control of a functionally linked promoter.

46. A recombinant molecule comprising a nucleic acid sequence encoding at least two proteins as listed in Table 5 and/or table 6, and/or an immunogenic part or analogue or derivative of either or both of said proteins under the control of a functionally linked promoter.

47. A live recombinant carrier comprising a nucleic acid sequence according to claim 45 or 46.

48. An isolated host cell comprising a nucleic acid sequence according to claim 45 or 46.

49. An isolated and/or recombinant proteinaceous molecule that has at least 80% sequence identity to a protein encoded by a nucleic acid according to claim 45 or 46.

50. An isolated and/or recombinant proteinaceous molecule that has at least 95% sequence identity to a proteinaceous molecule encoded by a nucleic acid according to claim 45 or 46.

51. An isolated and/or recombinant proteinaceous molecule comprising a stretch of at least 25 consecutive amino acids of a proteinaceous molecule encoded by a nucleic acid according to claim 45 or 46.

52. A nucleic acid encoding a proteinaceous molecule according to any of claims 49 to 51.

53. An immunogenic composition according to claim 40 or 41, said composition comprising an isolated and/or recombinant proteinaceous molecule according to any of claims 49 to 51.

54. An immunogenic composition capable of eliciting an immune response against *Streptococcus uberis,* said composition comprising a live or killed recombinant carrier according to claim 47.

55. An immunogenic composition according to claim 54, wherein said live or killed recombinant carrier is a *Streptococcus species.*

56. An immunogenic composition according to claim 54 or 55, wherein said live or killed recombinant carrier is a *Streptococcus uberis.*

57. An immunogenic composition capable of eliciting an immune response against *Streptococcus uberis,* said composition comprising a nucleic acid according to claim 45 or 55.

58. An immunogenic composition according to claim 41 or 42 and/or claims 53 to 57 as a medicament.

59. Use of an immunogenic composition according to claim 41 or 42 and/or claims 53 to 57 for the preparation of a medicament against *Streptococcus uberis* mastitis.

60. Use of an immunogenic composition according to claim 41 or 42 and/or claims 53 to 57 for the preparation of a vaccine.

61. Use of an immunogenic composition according to claim 41 or 42 and/or claims 53 to 57 for decreasing and/or controlling the number of *S.uberis* organisms in the milk and/or an udder of a cow.

62. A pharmaceutical composition comprising an immunogenic composition according to claim 41 or 42 and/or 53 to 57 and a suitable carrier.

63. A method for measuring the immunity of an animal against *S.uberis,* said method comprising determining in at least one sample from said animal the presence of antibodies directed against a protein selected from Table 5 and/or Table 6, or a protein according to any one of claims 49 to 51 or an immunogenic part thereof.

64. A diagnostic kit comprising at least one protein selected from Table 5 and/or Table 6, or a protein according to any one of claims 49 to 51 or an immunogenic part thereof and a means of detecting antibody binding to said protein or immunogenic part thereof.

65. A method for detecting *S.uberis* immunogenic strains, said method comprising isolating nucleic acid from a *S.uberis* organism from a case of

mastitis, subjecting said nucleic acid to a PCR comprising a nucleic acid according to claim 45, 46 or 52, or a primer thereof.

Fig. 1A

FACS analysis on intact *S. uberis* strain 41-241

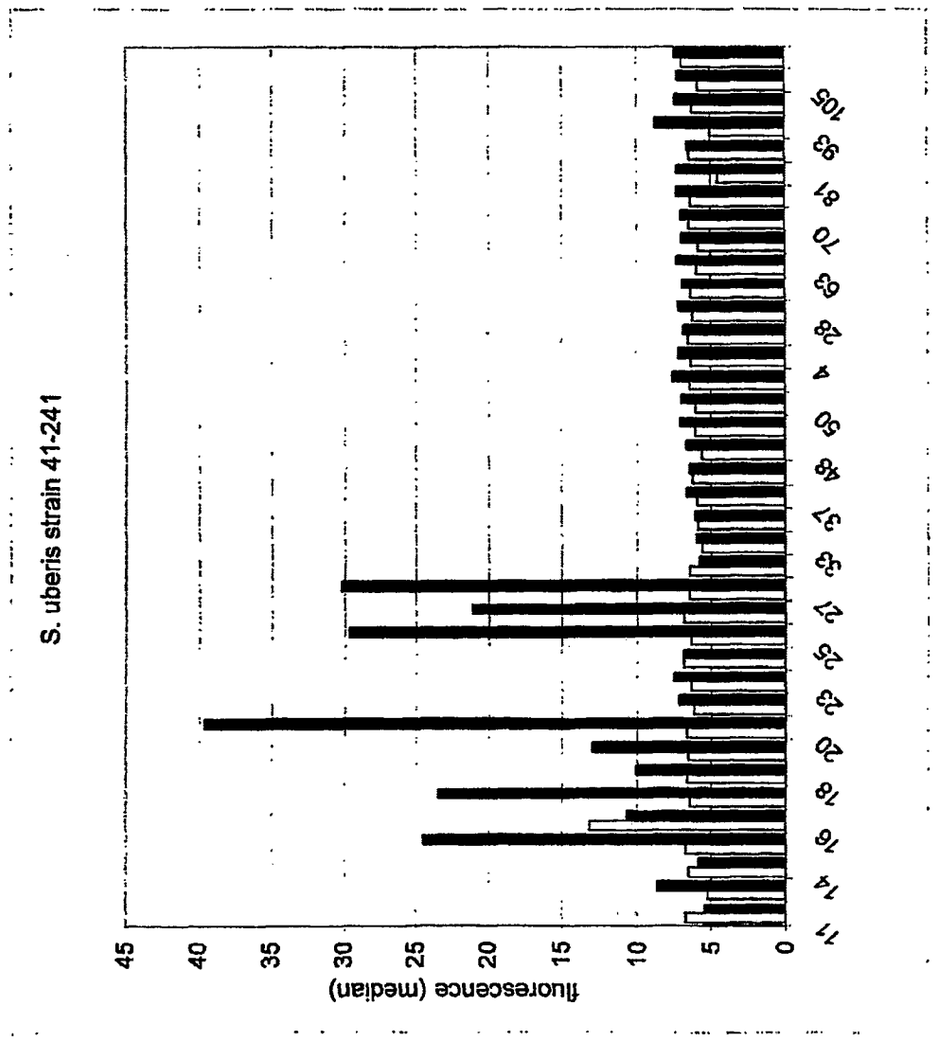
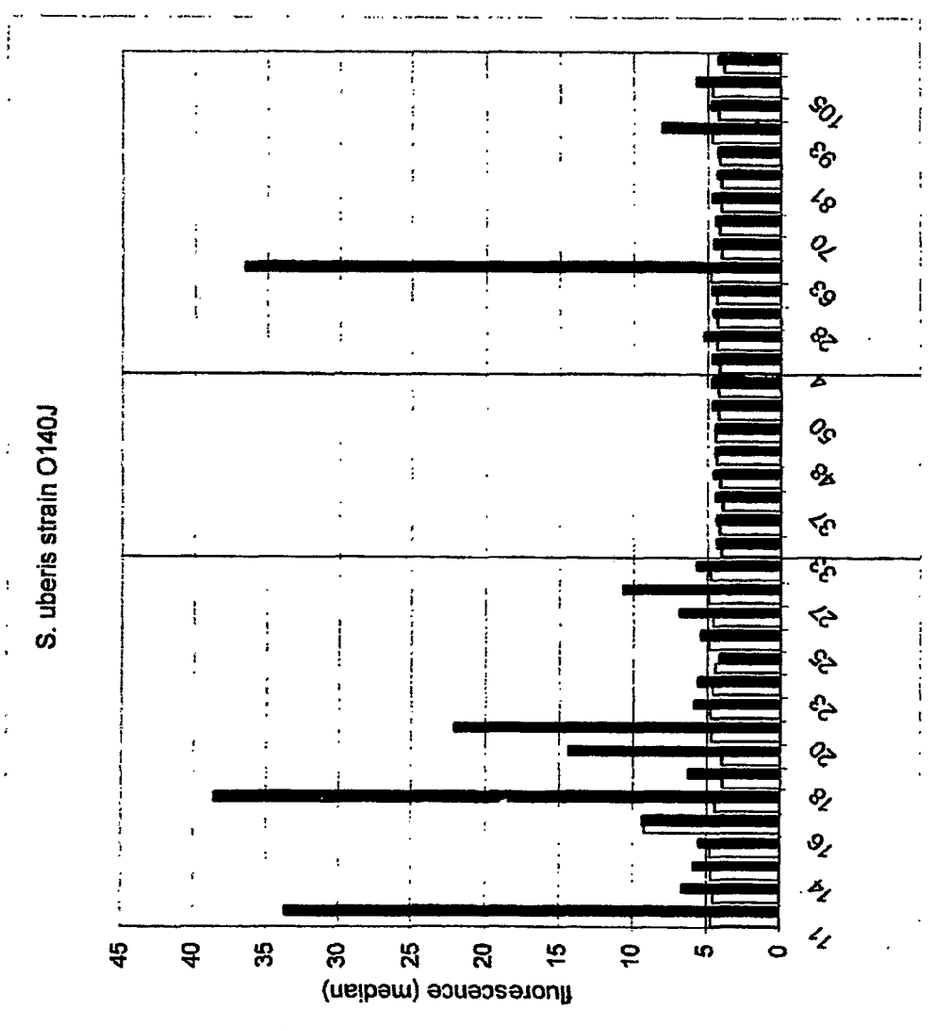
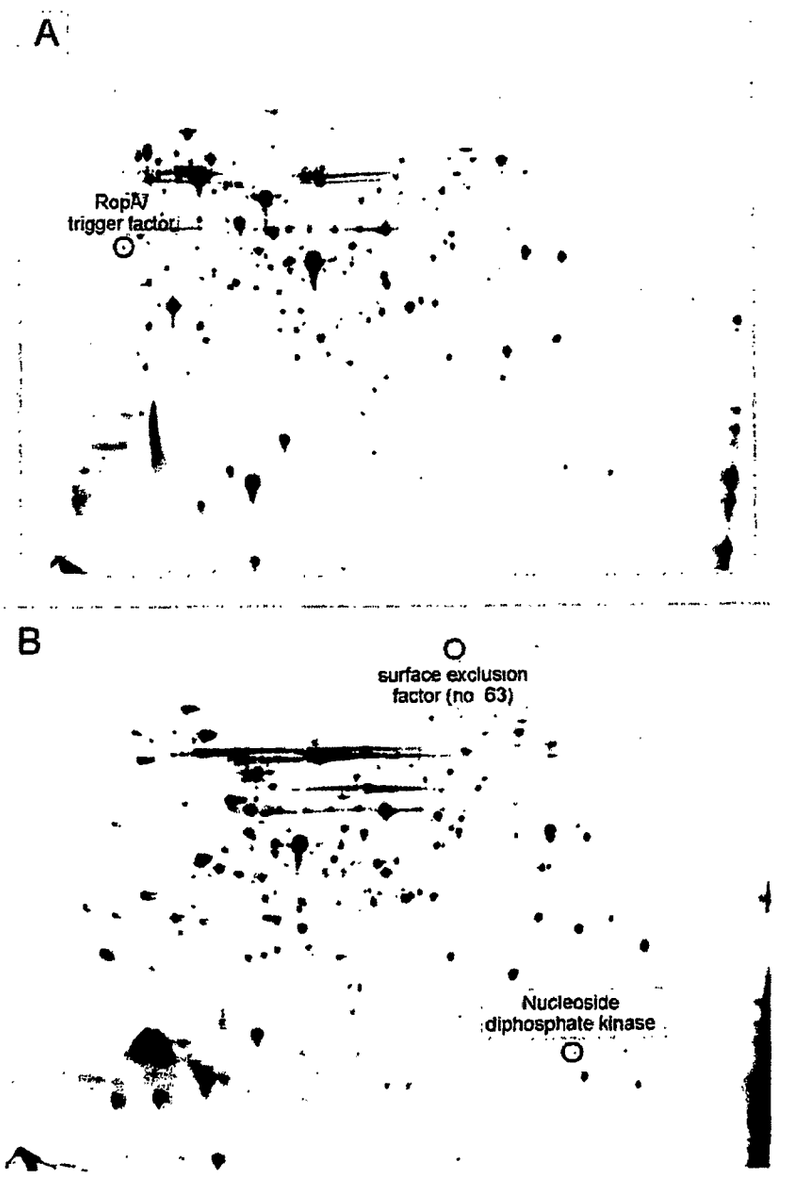


Fig. 1B

FACS analysis on intact *S. uberis* strain O140J





Coomassie brilliant blue stained 2D proteome patterns.

Fig. 2

Fig. 3A

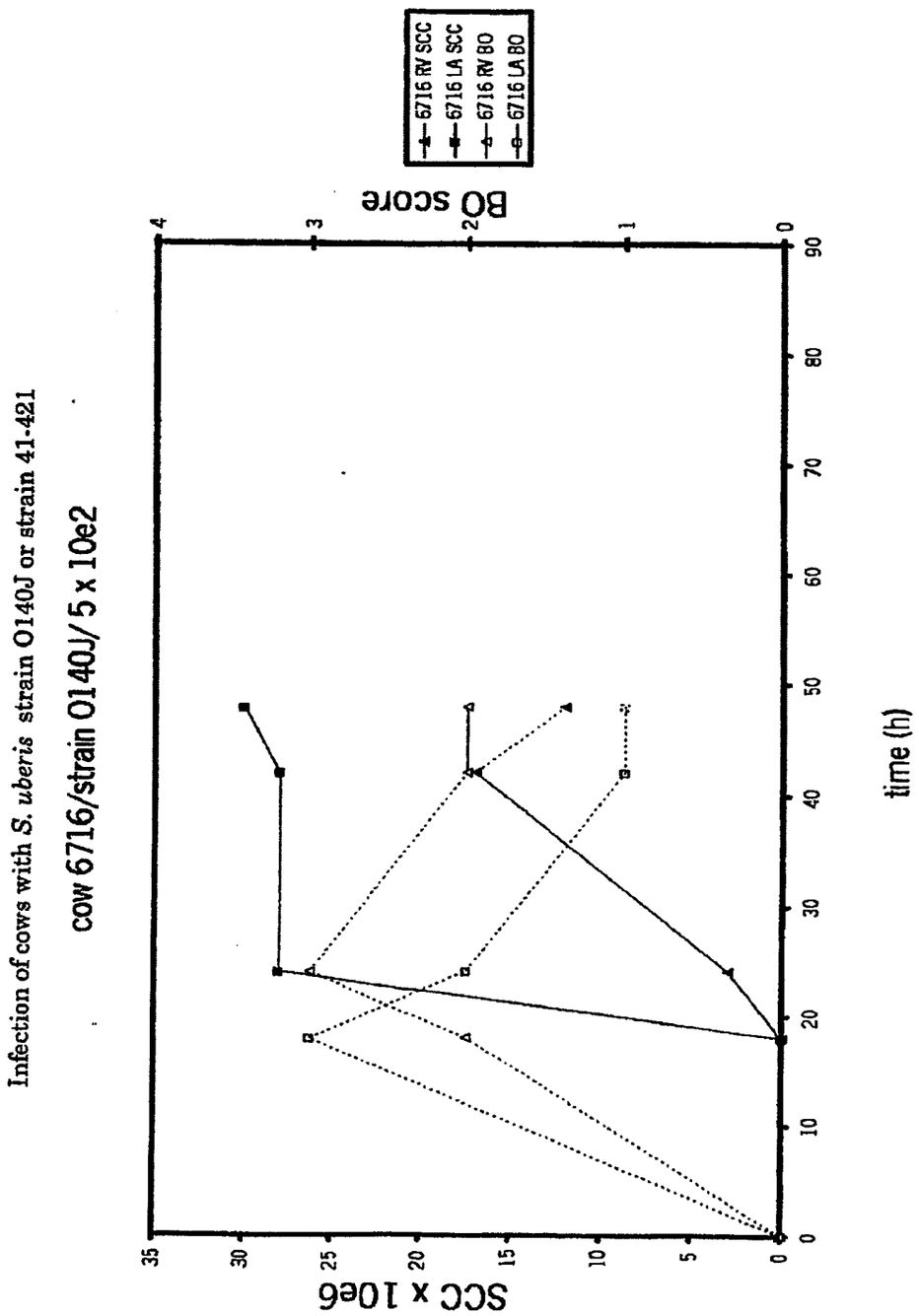

Infection of cows with S. uberis strain O140J or strain 41-421
cow 6716/strain O140J/ 5 x 10e2
6716 RV SCC
6716 LA SCC
6716 RV BO
6716 LA BO
BO score
SCC x 10e6
time (h)

Fig. 3A, Condt.

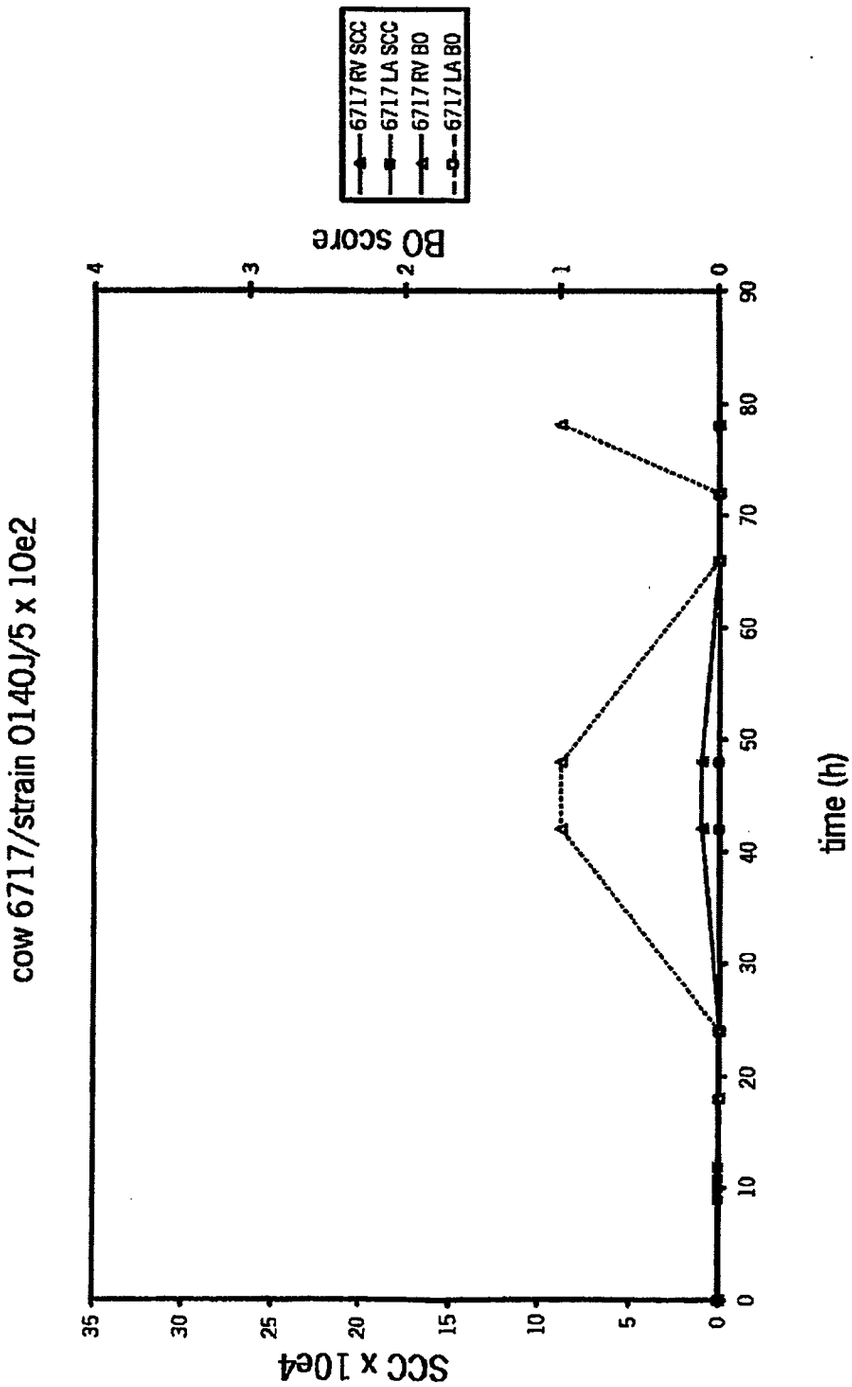

6717 RV SCC
6717 LA SCC
6717 RV BO
6717 LA BO
BO score
SCC x 10e4
time (h)
cow 6717/strain 0140J/5 x 10e2

Fig. 3A, Condt.

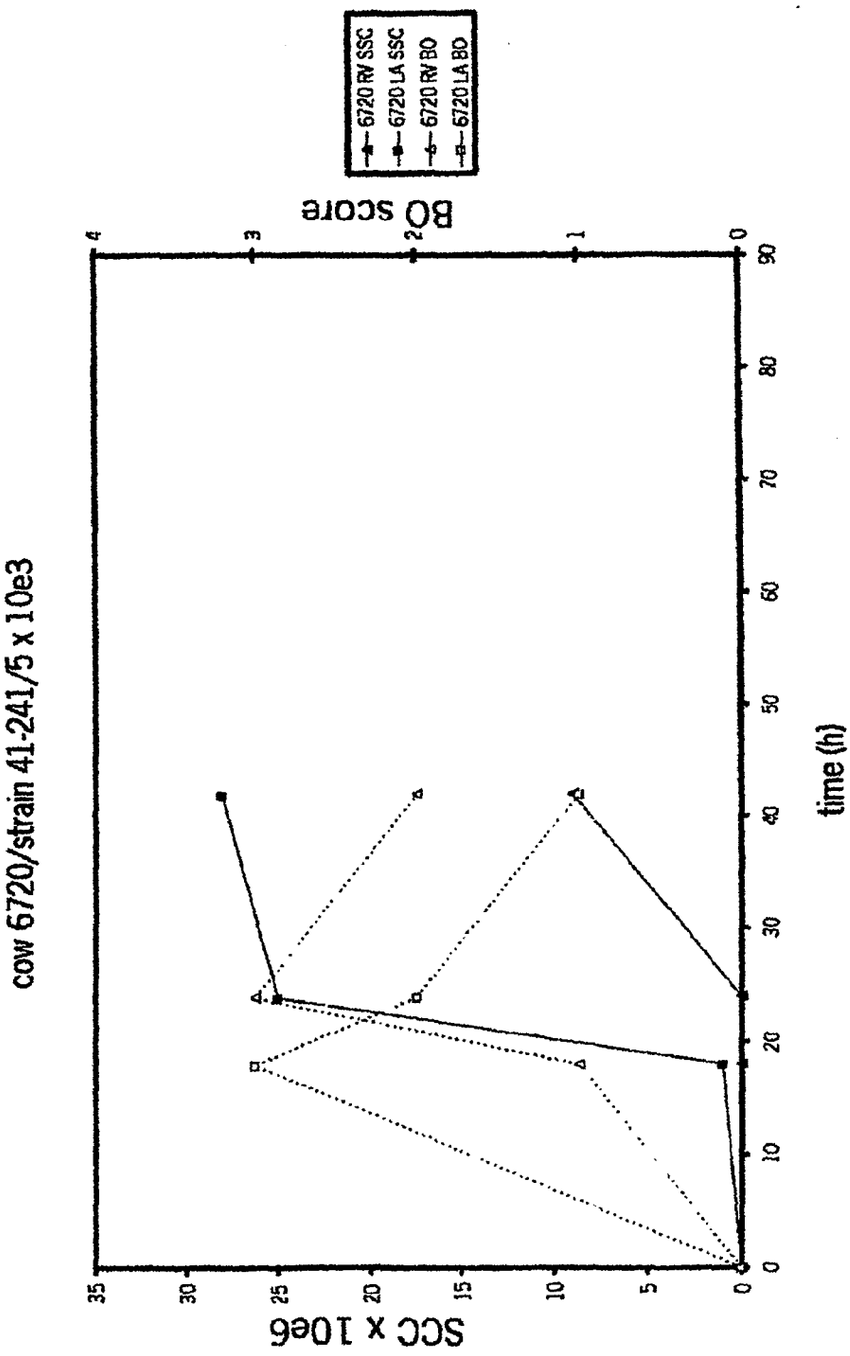

6720 RV SSC
6720 LA SSC
6720 RV BD
6720 LA BD
BD score
SCC x 10e6
time (h)
cow 6720/strain 41-241/5 x 10e3

Fig. 3A, Condt.

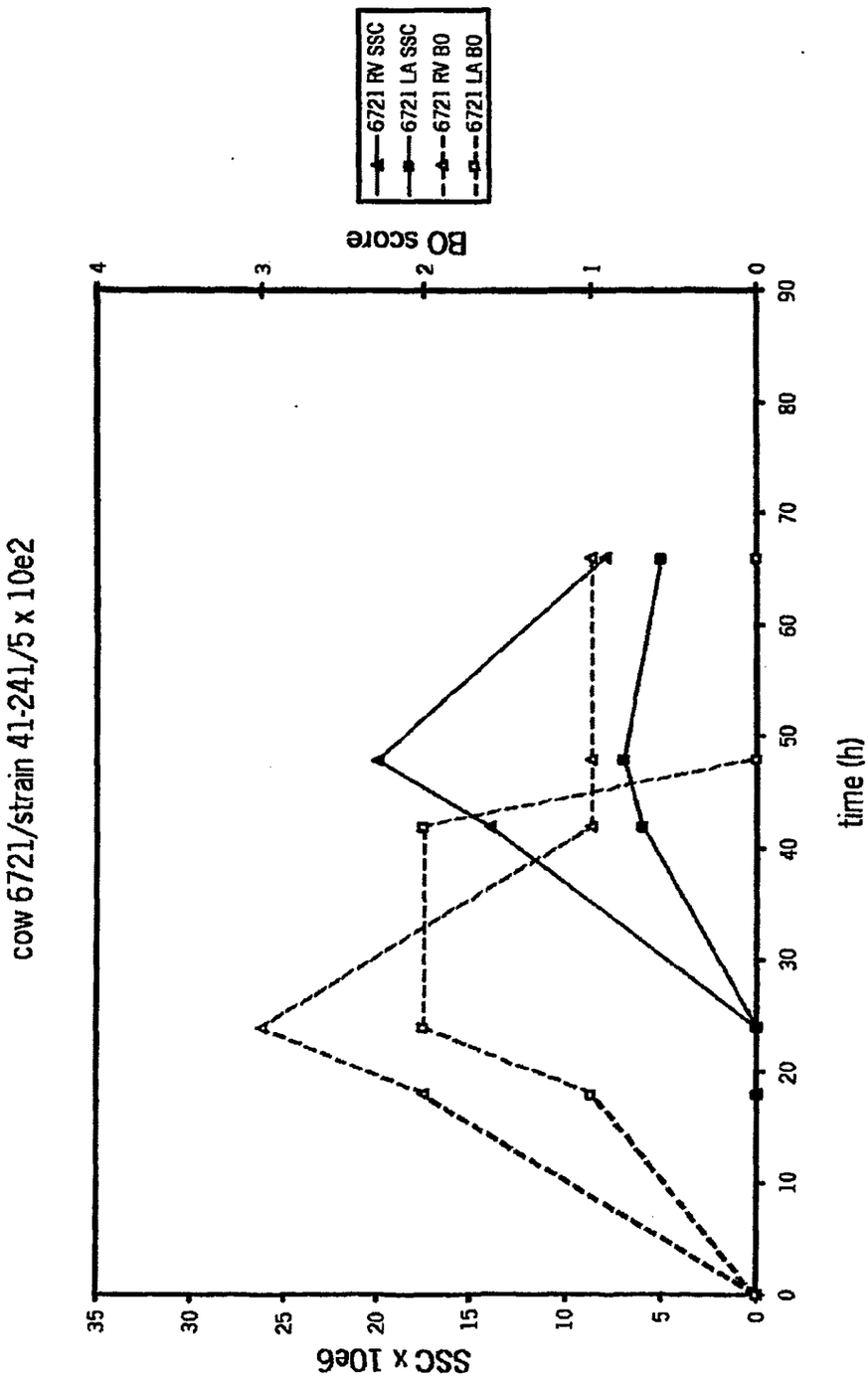

6721 RV SSC
6721 LA SSC
6721 RV BO
6721 LA BO
BO score
SSC x 10e6
time (h)
cow 6721/strain 41-241/5 x 10e2

Fig. 3B

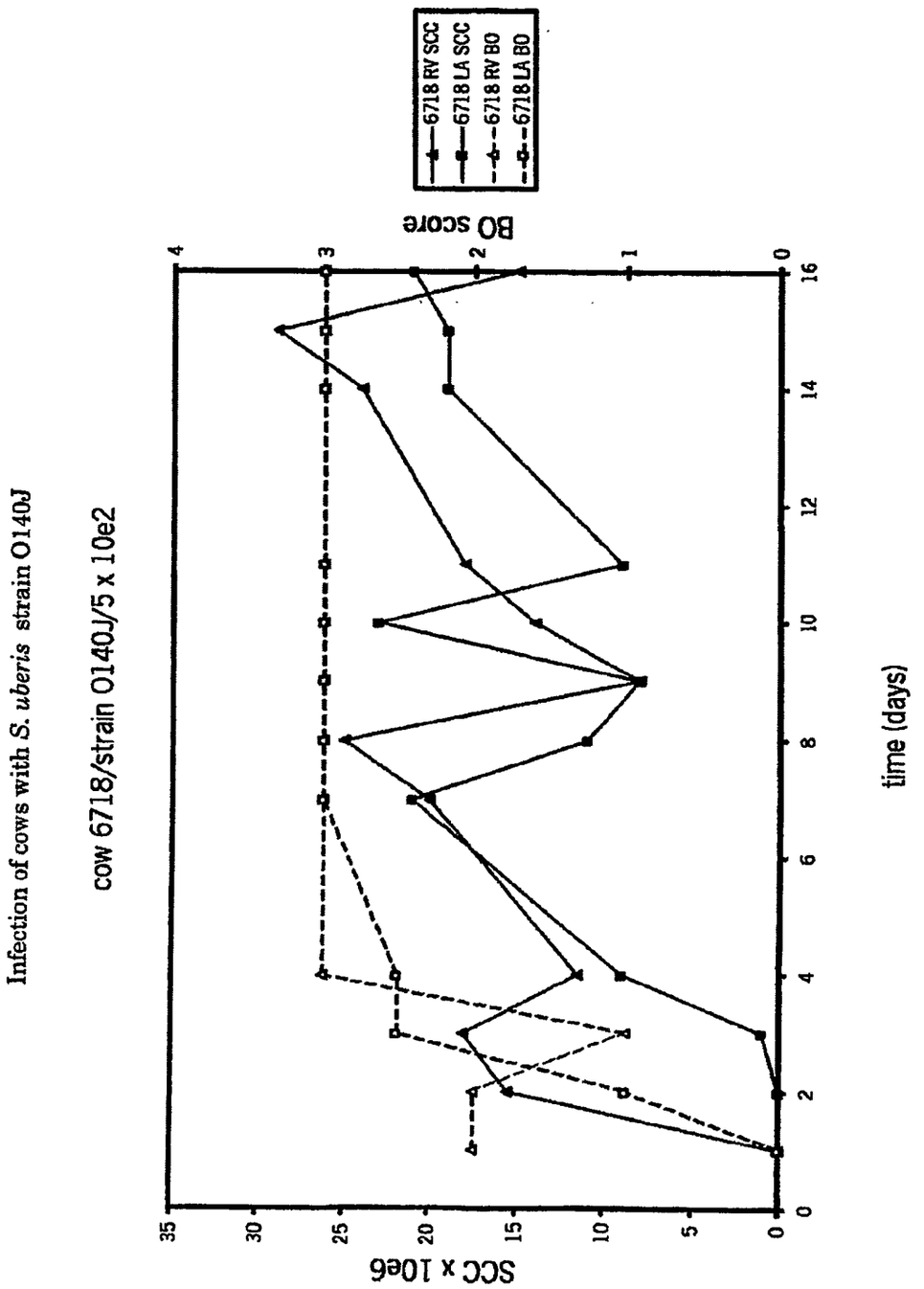

Infection of cows with S. uberis strain O140J
cow 6718/strain O140J/5 x 10e2
6718 RV SCC
6718 LA SCC
6718 RV BO
6718 LA BO
BO score
SCC x 10e6
time (days)
0
1
2
3
4
0
5
10
15
20
25
30
35
0
2
4
6
8
10
12
14
16

Fig. 3B, Condt.

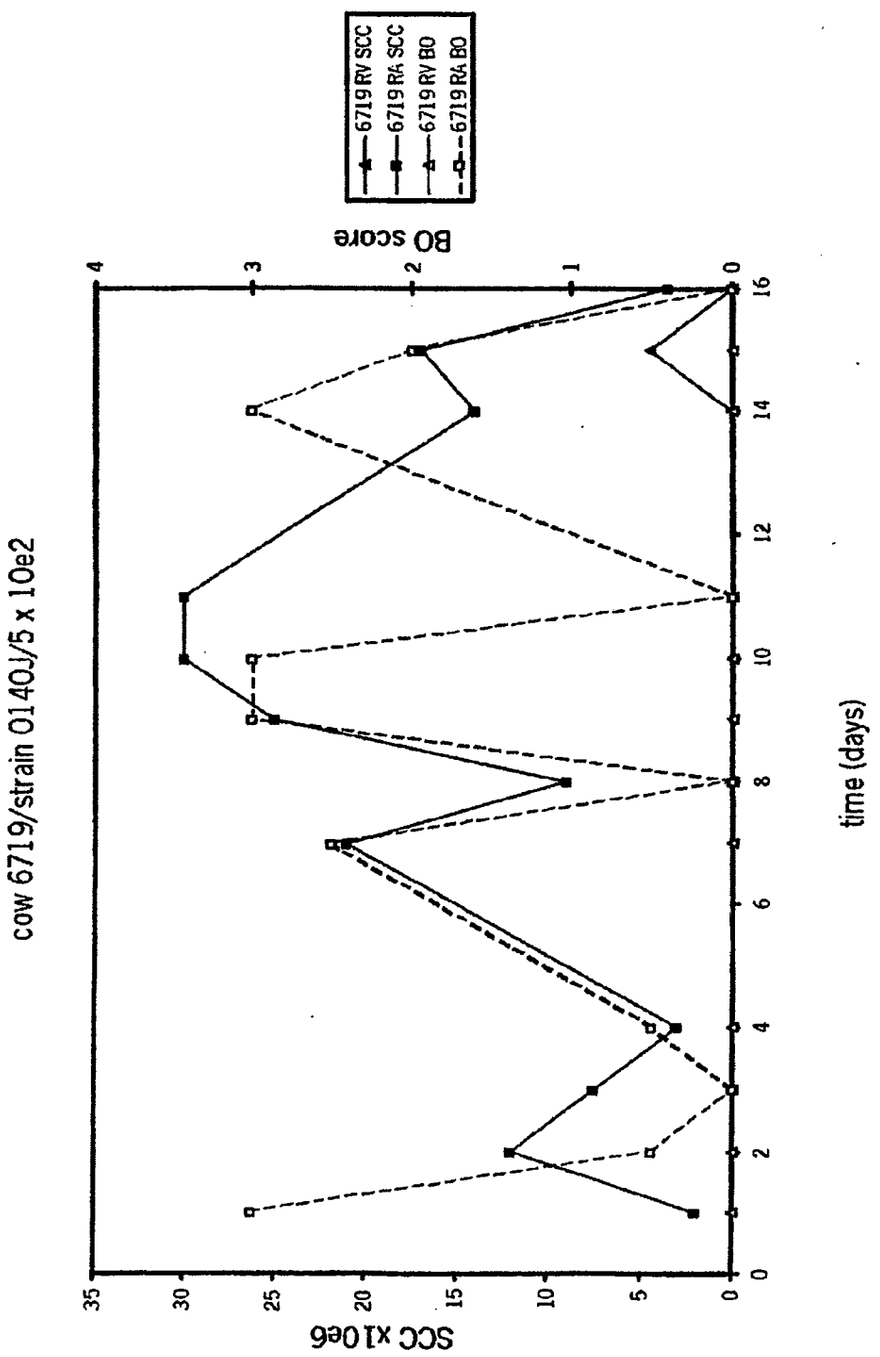

6719 RV SCC
6719 RA SCC
6719 RV BO
6719 RA BO
BO score
SCC x10e6
cow 6719/strain 0140J/5 x 10e2
time (days)

Fig. 3B, Condt.

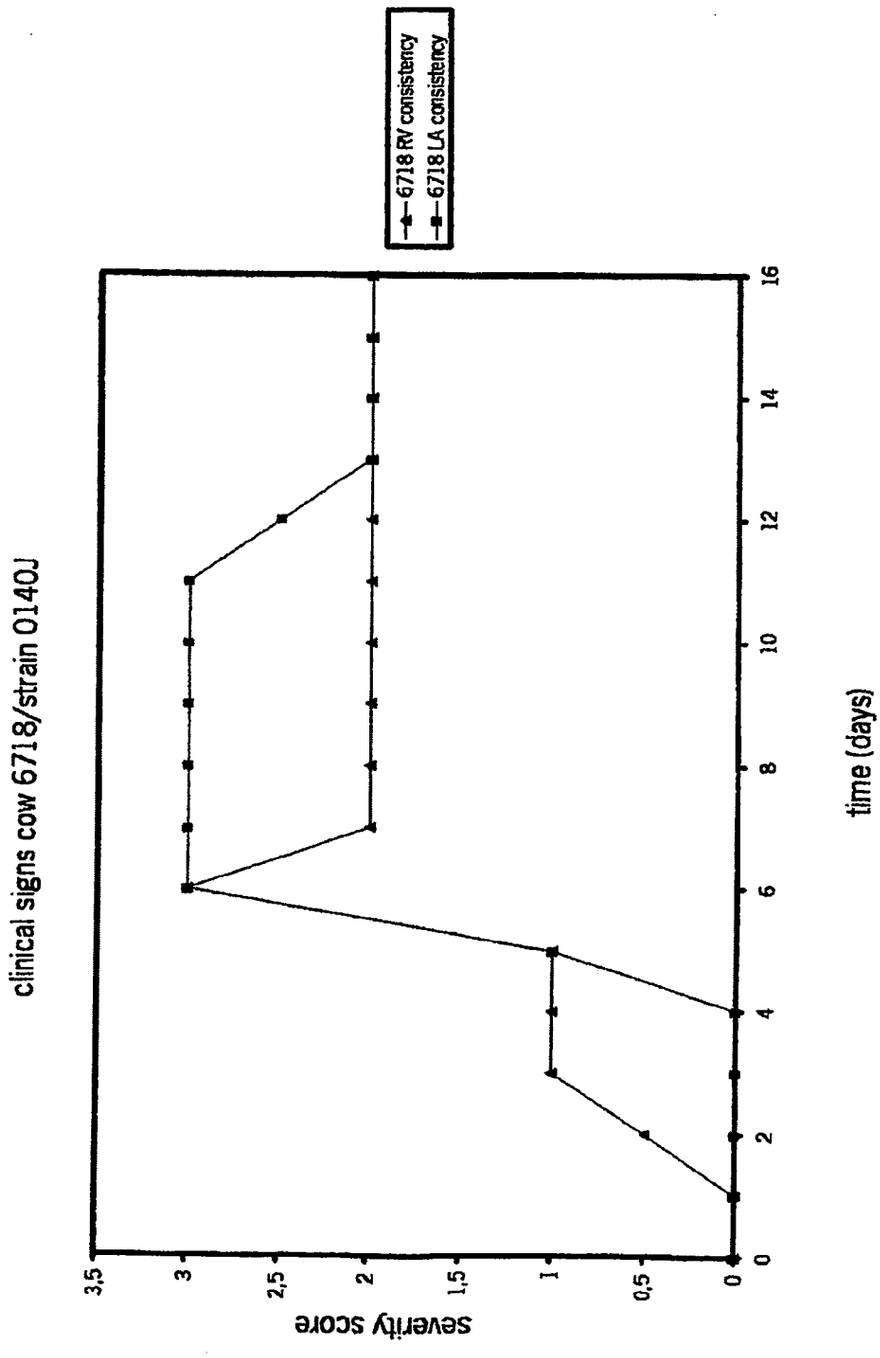

6718 RV consistency
6718 LA consistency
clinical signs cow 6718/strain 0140J
severity score
time (days)
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
0
2
4
6
8
10
12
14
16

Fig. 3B, Condt.

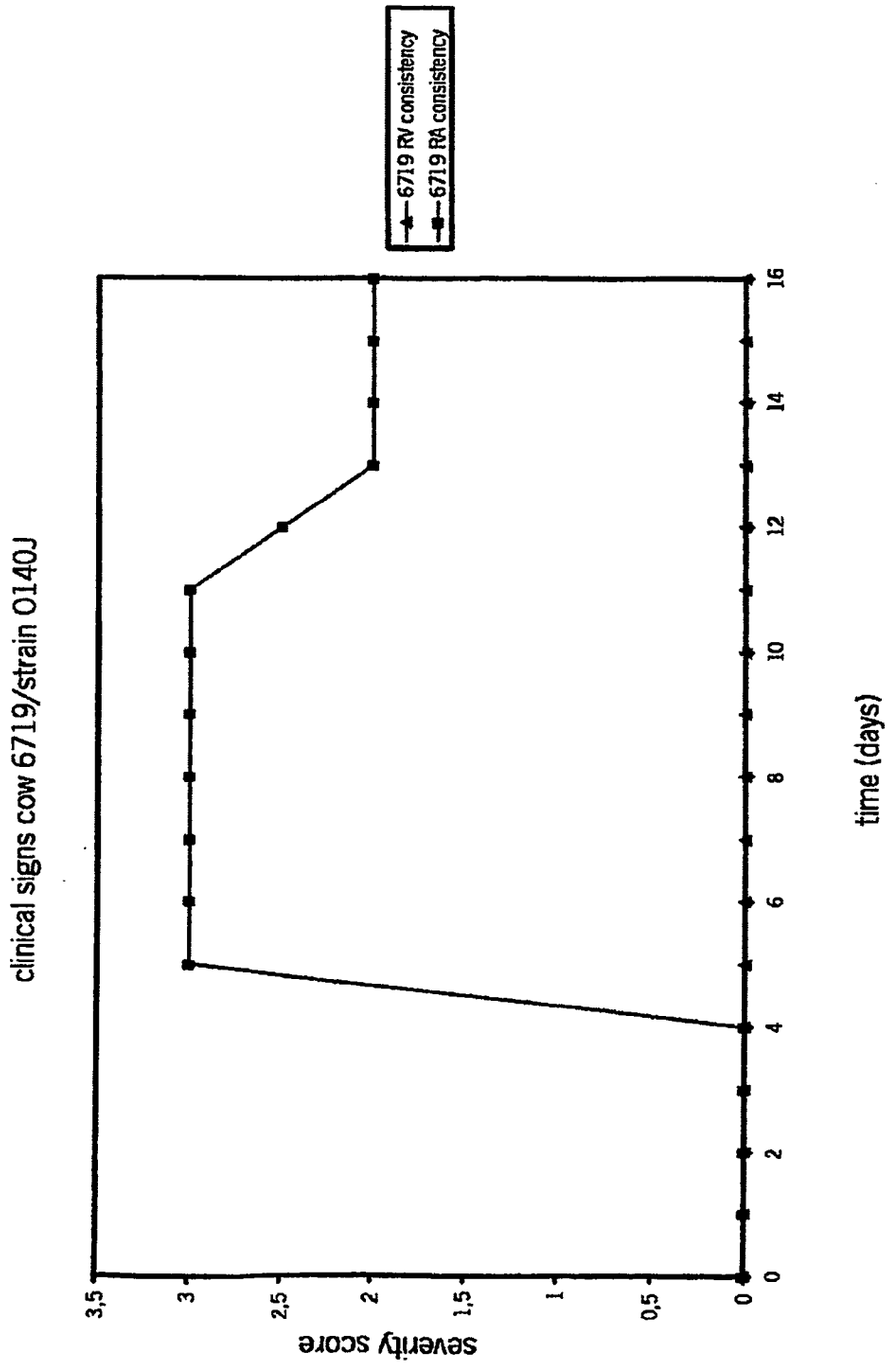

6719 RV consistency
6719 RA consistency
clinical signs cow 6719/strain 0140J
severity score
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
time (days)
0
2
4
6
8
10
12
14
16

Fig. 3C

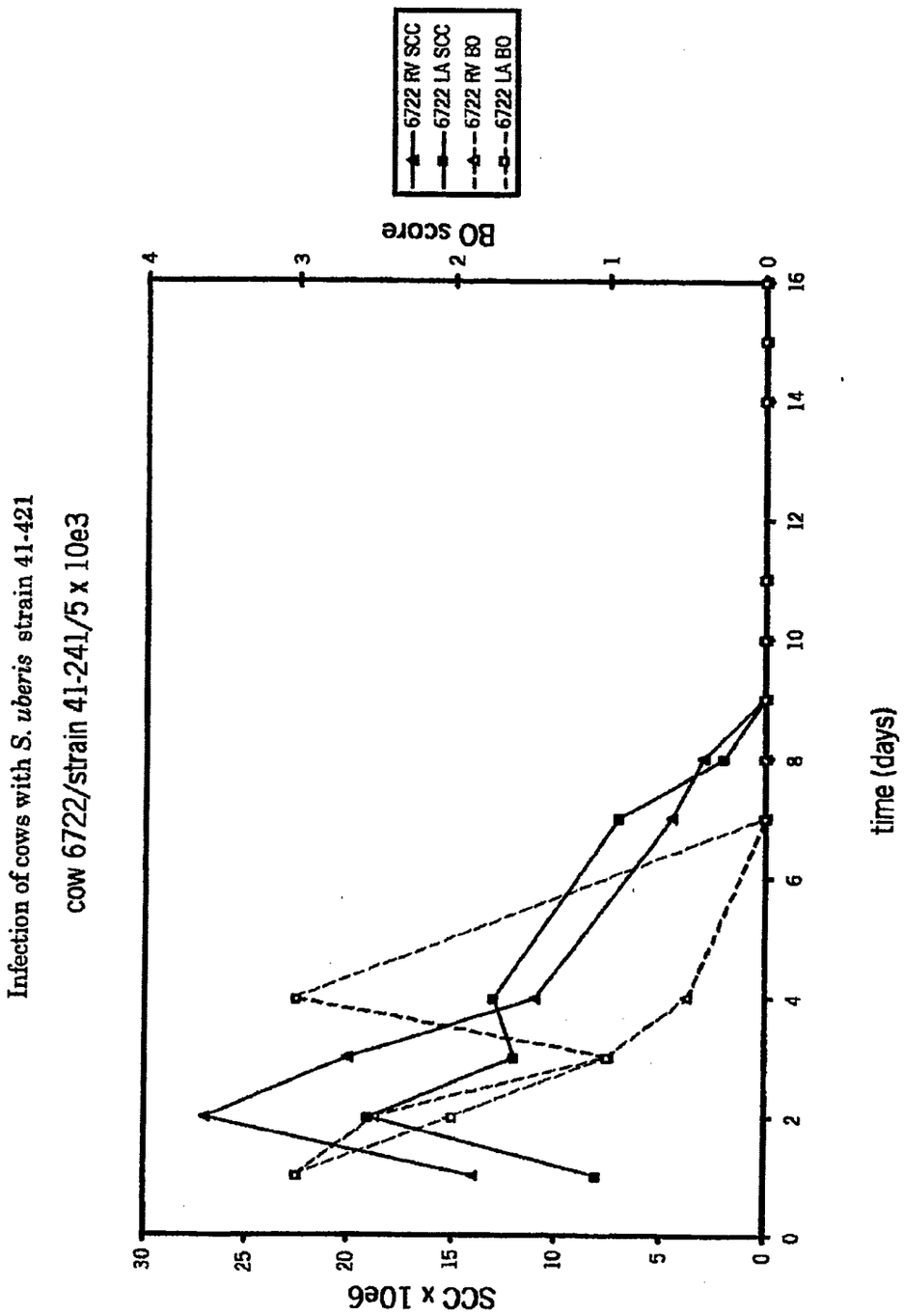

6722 RV SCC
6722 LA SCC
6722 RV BO
6722 LA BO
BO score
SCC x 10e6
time (days)
Infection of cows with S. uberis strain 41-421
cow 6722/strain 41-241/5 x 10e3

Fig. 3C, Condt.

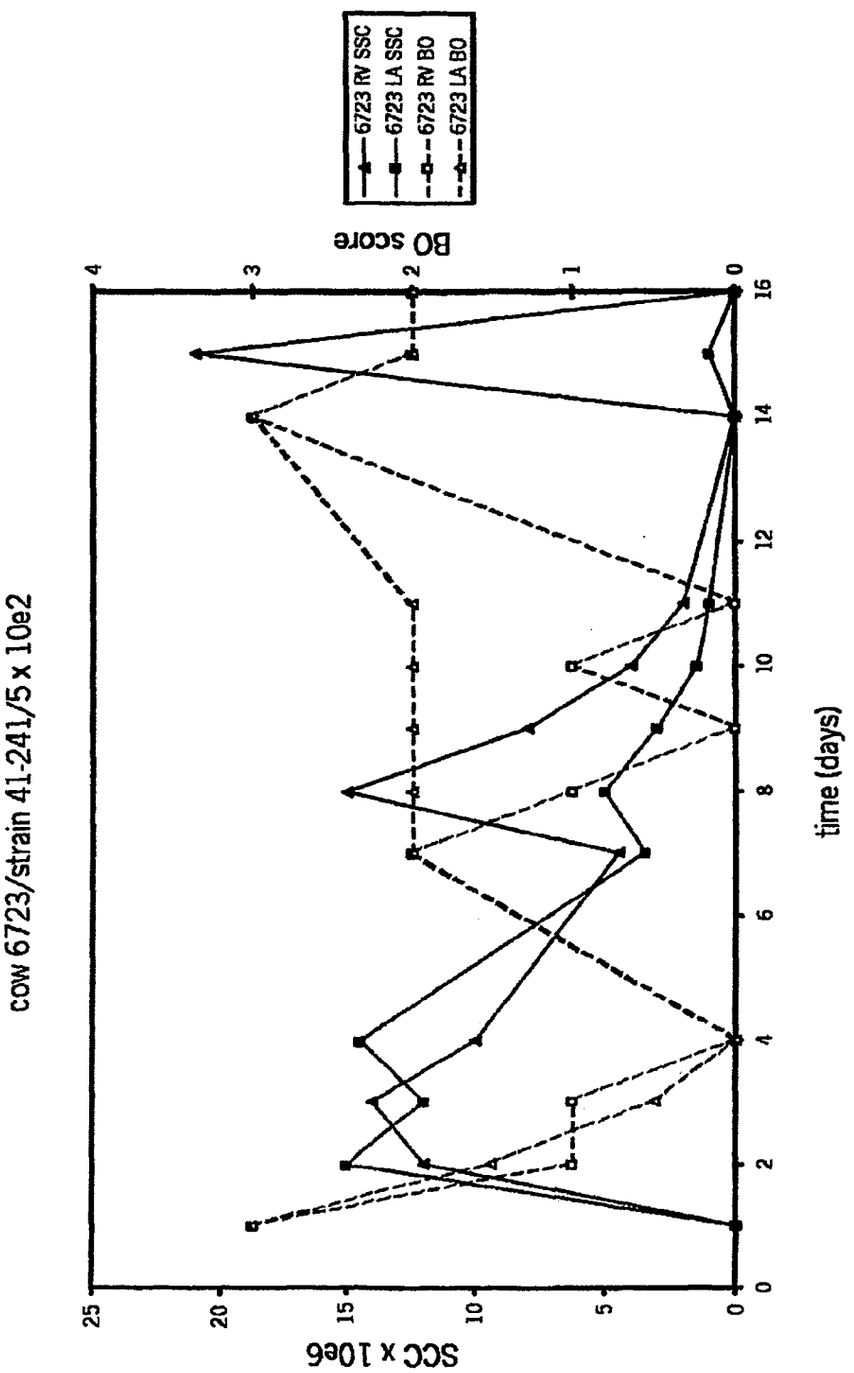

6723 RV SSC
6723 LA SSC
6723 RV BO
6723 LA BO
BO score
SCC x 10e6
time (days)
cow 6723/strain 41-241/5 x 10e2

Fig. 3C, Condt.

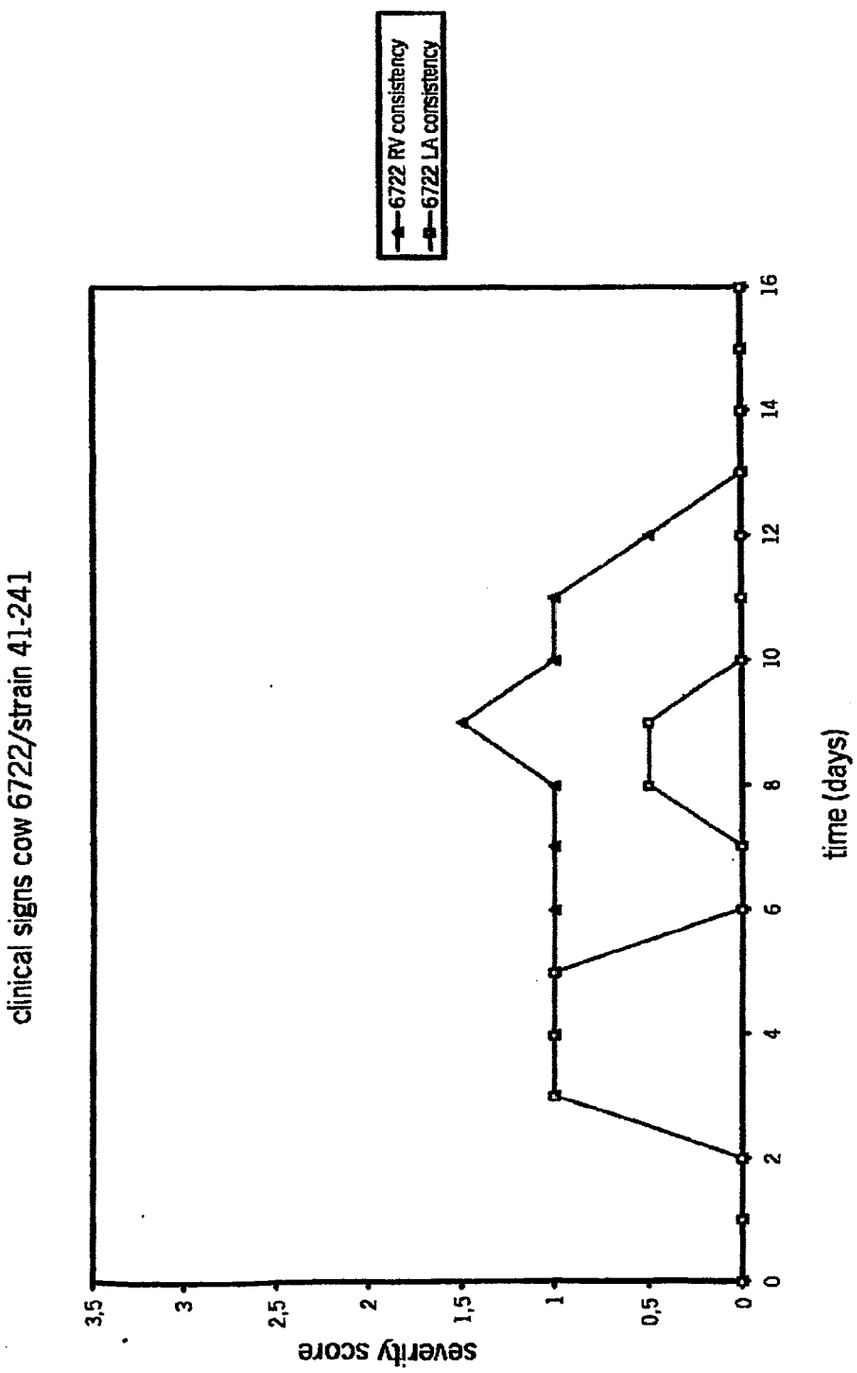

6722 RV consistency
6722 LA consistency
clinical signs cow 6722/strain 41-241
severity score
time (days)
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
0
2
4
6
8
10
12
14
16

Fig. 3C, Condt.

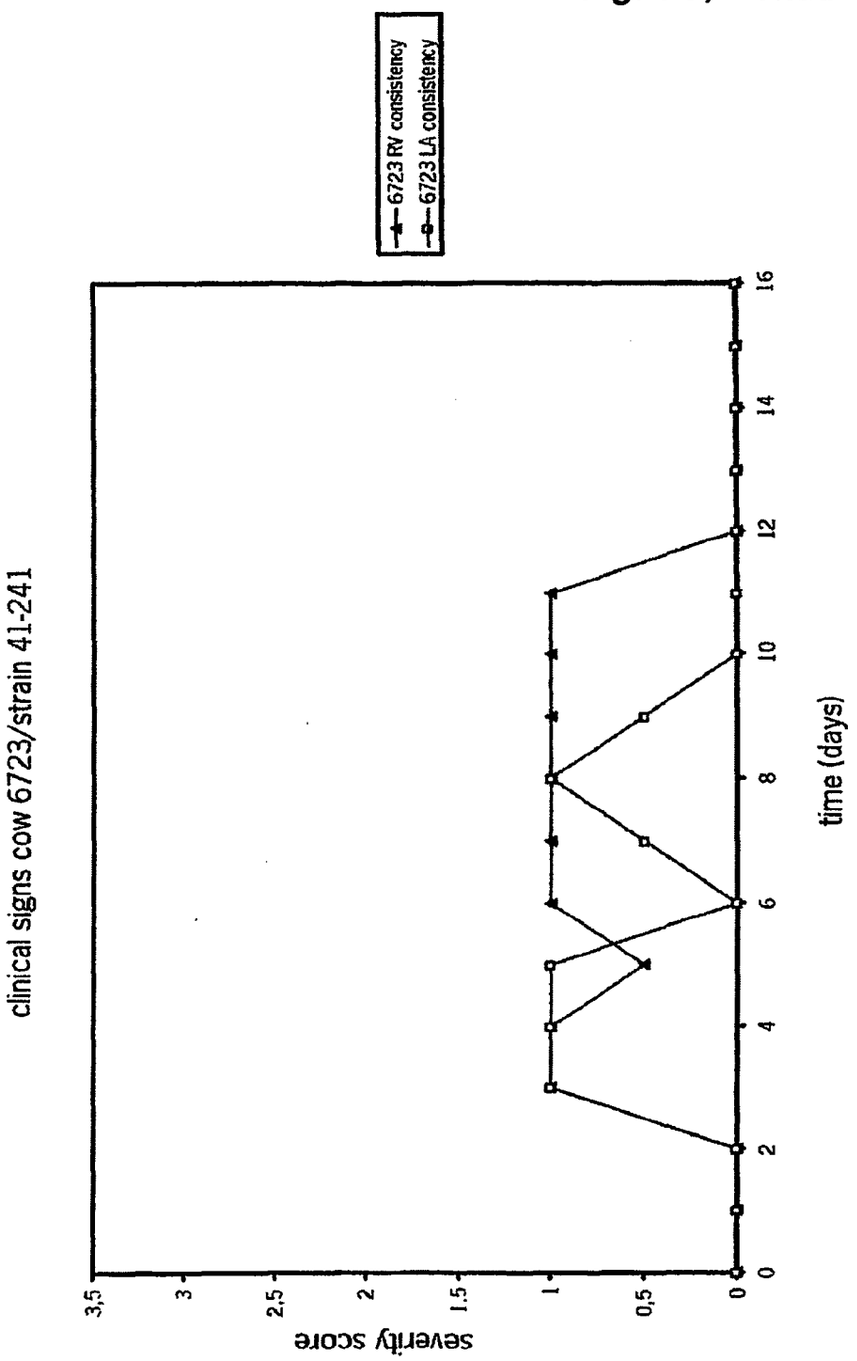

6723 RV consistency
6723 LA consistency
clinical signs cow 6723/strain 41-241
severity score
time (days)
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
0
2
4
6
8
10
12
14
16

Fig. 4

Nucleic acid sequences and amino acid sequences of *S.uberis* proteins of table 5

SEQ ID 4

atgactgagaacctaatcggaaatttatcgttattcgaactttcaatcttattattacttatttttgttgctgcatattt
tatttatttagcagttcgtgactatcgaaatgccaaaattattcggcaaatgagtcataaaatccgtgacctaatcaatg
gtcgttacacggatgaaatcaatgaaaaagctgatattgagctcattgaactttcagagcaactcaatgatttatcggat
gtctttcgattgacccatgaaaatcttgcccaggaaaaaaatcgcttagccagtattttggcctacatgagtgatgggct
tttggcaacagaccgaactggtcaaatcatgatgattaacgaaaccgcccaaaaacaattgaatatttcgaaagaagaag
ccctttaatgaatatcacggatttgttagggcaagacactccctatacctaccgggaattggtttccaaaacaccgatt
gttaccttgaatagacgcgatgagactggtgaatttatcaccctcaggctgcgctttgccttgaatagaagagaaagtgg
attcatttcggggcttgttgtcgtcctacatgacactaccgaacaggaaaaagaagaacgtgagcgtcgcctctttgttt
cgaatgttagtcacgaattaagaacgccattgacatcagtcaaatcctatttggaagccctggatgagggtgccttaaaa
gaagatatcgcaccaagtttcatcaaagtttcactagatgaaaccaatcggatgatgcgaatgatttcggacttgttaaa
cctgtctcgtattgataaccaagtcacagctctagcagttgaaatgaccaatttcacagcctttatgacttctatactaa
atcgttttgatttagtgagaaaccaaaatacagtttcagggaaaagctatgaaattatacgagattatcctattacttct
gtttggctagaaattgacaatgataaaatgacacaagtcattgaaaacattttaaataatgctatcaaatattcacctga
tggtggtaaaattcgtgttaagatgaaaacaacagatagtcaattgattatctctatttcggatcaaggattaggaattc
caaagaaagatcttcctttgatttttgaccgattttatcgggtggataaagcacgcagtcgtgcacaaggtggaacaggt
ttaggacttgccattgctaaagaaattgtaaaacaacataatggttttatatgggcaaaaagtgactatggcaaaggctc
gacctttacaattgtattgccatatgaaaaagatgttgttgcaggaacagatgatgaatgggaggatgatattgac

MTENLIGNLSLFELSILLLLIFVAAYFIYLAVRDYRNAKIIRQMSHKIRDLINGRYTDEINEKADI
ELIELSEQLNDLSDVFRLTHENLAQEKNRLASILAYMSDGVLATDRTGQIMMINETAQKQLNI
SKEEALLMNITDLLGQDTPYTYRELVSKTPIVTLNRRDETGEFITLRLRFALNRRESGFISGLVV
VLHDTTEQEKEERERRLFVSNVSHELRTPLTSVKSYLEALDEGALKEDIAPSFIKVSLDETNR
MMRMISDLLNLSRIDNQVTALAVEMTNFTAFMTSILNRFDLVRNQNTVSGKSYEIIRDYPITSV
WLEIDNDKMTQVIENILNNAIKYSPDGGKIRVKMKTTDSQLIISISDQGLGIPKKDLPLIFDRFY
RVDKARSRAQGGTGLGLAIAKEIVKQHNGFIWAKSDYGKGSTFTIVLPYEKDVVAGTDDEWE
DDID

SEQ ID 5

atgaaattcataaaaatcttattatctcaaatcgtcagtctatttttgctcttaacaatcagtttacatgctttagagac
agtcaatgcagctgtactgggggatgactatcccattgcatggaaatccggttggggtacagacacttgggaatgtacc
gaaggcaatgcacctcatttgttgcttttagattgaatcaagtaaatgggctttcaatcccttctggtttaggaaatgct
gatacttggggtcatattgctagacgaatgggtatcctgttaatgatatcccagcagtaggagccgttgcctggtttga
taaaggaataaatggttctcatcttgcctatggacatgtctcctgggttgcggaggttaatggtaatctagttaccttag
aagaatataatttgatgccggacaaggtcctgaacaatatcatagaagagtcattaacagtcatcaagtcagtggtttt
attcatttcaaagatgtcgatactggaagtattcccatctcttctcctatgcaaagcccgagatcaacaattccaaacca
agggagttatcattttaccgaacagatgcccataaaagctcagcctattgccaatagccaagcaattgccttttaccagg
ccggccaaatggttcactatgataaaaccgtaattgctgatggttatcaatggctatcatacattgcctattctggtcaa
agacgctacatcccaattgctaaggtaacttctaaggaaagttcaaaacaggaggactttgccccaggtgaccaagttac
tttttctggtgtttaccaagtcactcaaattcatggtagcctgctttctagtaaggacttagctggtggagagcctggtc
ctctaaattggttagatccaggtcctgtccttgaaagcaacagagacggacaacaaagtggagatcaaatactctacccc
ggcgatttctttatcattccaggaaactacaaagttttacagattcacaaggaaacaaaaggtctccttattcaaatagg
aaaccgacaaacttgggtatcaatgaacaaggttcagaaatctaca

MKFIKILLSQIVSLFLLLTISLHALETVNAAVLGDDYPIAWKSGWGTDTWGMYRRQCTSFVAF
RLNQVNGLSIPSGLGNADTWGHIARRMGYPVNDIPAVGAVAWFDKGINGSHLAYGHVSWVA
EVNGNLVTLEEYNFDAGQGPEQYHRRVINSHQVSGFIHFKDVDTGSIPISSPMQSPRSTIPNQG
SYHFTEQMPIKAQPIANSQAIAFYQAGQMVHYDKTVIADGYQWLSYIAYSGQRRYIPIAKVTSK
ESSKQEDFAPGDQVTFSGVYQVTQIHGSLLSSKDLAGGEPGPLNWLDPGPVLESNRDGQQSG
DQILYPGDFFIIPGNYKVLQIHKETKGLLIQIGNRQTWVSMNKVQKST

SEQ ID 9

atgactattatcaaaaacatcctggtgaaaataagctgttgccatagtaaagccttcacccttgcggagagtctcctgtg
tctggcagtgacgaccttcaccattctgttgctaagtagctctctggcgggtgtttatgaaagtgtggaaagagaattgt
ttttcatttcctttgaacatttttatcgtcattgtcaaaaaatgagtgttttaaaacaagaagaaagtgctttgcacttt
acagcacatcgtatcaaatatggtcagcgtgaattagtgattccagatcatattcgattgttaaatcaagggactatccc
ttttaacaaaacaggtggtagtcattccttagcaaaaattgagtggcaaacaccaagggagaaattgacataccagctaa
atctagggagtggaaattatcaaaaacgaagacat

MTIIKNILVKISCCHSKAFTLAESLLCLAVTTFTILLLSSSLAGVYESVERELFFISFEHFYRHCQ
KMSVLKQEESALHFTAHRIKYGQRELVIPDHIRLLNQGTIPFNKTGGSHSLAKIEWQTPREKL
TYQLNLGSGNYQKRRH

SEQ ID 11

atgatcaatctaaaggtaaatactgtccctattcaaaaggagaaaggaattatgaagcaagaaaagaaatgtgttaattg
gtttatgcgcaagcgggggaaacaatggatttatggttgtggcattttaatttgtggcttggttttcggagttgaagcta
cttcagtcgctgctgagactattccaacaacagcaacagttgagactttaaattcagatgtaacaagtaagacatctcaa
gaaacacagaagactactgaaatagcaacaccagtttcagaaatagttatgccatctcaacaaaaagttgttgaggaggt
aactcaagaagttagcgtacaaaatcaagagacggtcataaatatgcctgtgttaactcaaggagtaaatatagcaggac
caaatgaaacggctatattaacggattcgattgtccaaaacaatgttcaacctattgatagagttgagaaaatggaaaca
tccttttctaccgaattgactaagaaagctgaaagtagctataatacaaatcttcaagatttgaattatgatccaaatgt
ttgggaagttcgtgaagatggtttgtatagtaacgctgttggaaaaggtgacaatttcctattttcagcatcaactggtg
aaaactttatcttccaaacagacgtaaccttcttcaaaataccggagcagcttcactcgttttccgttcaaacaatgat
cctgaaaatctcaatggttatgttgttaatcttgatggaaattcacacaaagcaaggttatggcgttgggctgaagcaaa
tttaattaatgacaaagaaattctagccagtccggacaataaatatttcttaaaagtagtggcgactaacgggtggattt
catactacattaatggtattttgattgcaaacttgagcgactacactatacaacgtgatgaccttggtcaaacaacatat
attaaagatggtcattttggtcttttgaactggaatggtgaaatggtcttccaaaatacctttctaccgtgaattgacaaa
tgaagagttacctcttcttaatgatgtgacggtaacgtcaaaaaacggtccagttgaacctaaaggacaatttttttcag
agagttcagtttatattcaatatgtatcaaacgatgcctcaacggtggacttgagctttgatgctaataattcagatgca
ctaataacagtgactgatgctcatggtaaagtttattcaaatccaagcgcaattcctgtaactgttggaccaaattatct
cacggtgacaagtacttacacaacaacagatggctacgtaatcccctcaacataccgtattaatgttcaccggcgtcaac
cacagtcagtttattataatgaaaacttccgtgatcaatatcattactctgttaaagatggctgggcaaatgatcctaat
ggattagtttactataatggtgtttatcatatgttttaccaattctacgatgatacaaaatgggggccaatgcattgggc
acatgcaacaagtactgatttgattcattgggaagaccaaccaattgctttttatccagactataatggaacgatgttct
caggctgtatagtggcagatgttaataattctagtggacttttgatagtgaaaatggtggattagtagctctcattacg
attaacggggaagggcaacgcattaaacttgcatatagtactgatgaagggaaaacctggcaaaaagtggatgaaattgt
agcggattggactacagacccactacaaactcgtgattttcgtgaccctaaagttttccgttgggaaaataaatggttta
tggtaattgcaggtggaccactacgtctttattcatcagatgatcttaaaaattggactgtggaatcaacgtatccagat
cttcatacagaatgtccagatctttacccagtcttggcggaagatcagacagtgaaatgggttctttctcgcggtggtcg
ttattacaaagttggtgatttacaacaagctgacggaaattggaaattcataccagatgctaattaccaagaaacagata
gtatcatgaattttggtaaagattcatatgctgcgatgacatactatgtacaagattttggtaccaaagctaatccaact
attccaaagattattgaattgaattggatgaatacttgggataactattgcaaccttgtagctgatcgcttaggtcagtc
atttaatgggacttttaaccttaatttagaacttggtcttgtcaaagaaggtgataagtatgttcttactcagacaccgg
ttgaagcttatgaaagtttacgtgataatgacaacaaagttgaatacaaaaatgttgtcgttggtaaagaaaatgacctt
tttaaagatttttctggagatacttatgaaattgttgctcactttaaaccgagtgacaaaacaacaaaagttggtttcaa
ccttagagttggttcaggggagatgactaaggtttactatgatttgatagcaggacgaatcattatcgaccgaagtcaat
caggcattatattgacggaacttttagtaatattgatagtcaggctgtaacacctaatattgatggaagtattgatcta
cacatttttgttgatcgtgctagtgttgaagtttttcaaaaaatcatacagtagcaggggctaaccaaattttcacatc
agctcaaagtctaggattggaagtactcattgatggtgaagatgctaaagcagatattgtcttatatccattaaagagca
tctggaaaaataaaattattgatacaacaccccaaattgttattccagctagtgaaccaaaagtacggatgaatgtgggt
gatagcacaaccgtaaaagcttatgtttcaccagttggggcgagtcaagatcttatttggaatattagcaatccaagtct
agttttagatcaaatatcaggtaatcaggttttttcttaaagcgattaagaaaggacaagttattgtaagagcacagtcac
aatctaatccagcagtttatcaagatttattattgatatttagaagataacttcaatacaaatgttaaagatgtgaat
gtattttctggcgattggtacgttgatggcgaatctttgaaagttgcaaatcacaattcaaacgacatttacatgtcagc
agataagataccatatgaaaattatcaaatggacttggatataaaatatggtcgaggaattgtaaatatcttctttgctt
caggtaatcctgacgctaacaacgcttatactatccaatttggtagcaataattcagttcgtttgttccgcttctacaga
gatactatttttgaggcgccaatgatagatgtgattaatgacaatcaattccaccatgttcgattggtgaaatcagcaaa
tgtcatccatgtttatgttgataatgaaatggtaatgtcttacacatttgatcaagttgaagagtttttcaacaatccat
accttggcctaggtctttgggatggcgaactagctgttcagaacttttatgtaattgatttagatgcgcaaaaacctgtt
tttgttgaagagcatgagaaagagaaactactatcagaattaaaaaaatcagtggttaaaacaagttcatattcaactct
aaaaacaatagagacgtcttcaaaaacaaattctgagaacttagaagctccgactgtttctaagaaaaacttacctatga
caagtgatagtaacaataatttagaggaactgggtatattagtaattctaacgactttaggagctttttttaggacgcgtt
attttaaaaaaagaaaaataa

MKQEKKCVNWFMRKRGKQWIYGCGLLIAGLVFGVEAISVAAETIPPIATVETLNSDVTSKISQ
ETQKTTEIATPVSEIVMPSQQKVVEEVTQEVSVQNQETVINMPVLTQGVNIAGPNETAILTDSI
VQNNVQPIDRVEKMETSFSTELTKKAESSYNTNLQDLNYDPNVWEVREDGLYSNAVGKGDN
FLFSASTGENFIFQTDVTFLQNTGAASLVFRSNNDPENLNGYVVNLDGNSHKARLWRWAEAN
LINDKEILASPDNKYFLKVVATNGWISYYINGILIANLSDYTIQRDDLGQTTYIKDGHFGLLNW
NGEMVFQNTFYRELTNEELPLLNDVTVTSKNGPVEPKGQFFSESSVYIQYVSNDASTVDLSFD
ANNSDALITVTDAHGKVYSNPSAIPVTVGPNYLTVTSTYTTTDGYVIPSTYRINVHRRQPQSVY
YNENFRDQYHYSVKDGWANDPNGLVYYNGVYHMFYQFYDDTKWGPMHWAHATSTDLIHW
EDQPIAFYPDYNGTMFSGCIVADVNNSSGLFDSENGGLVALITINGEGQRIKLAYSTDEGKTW
QKVDEIVADWTTDPLQTRDFRDPKVFRWENKWFMVIAGGPLRLYSSDDLKNWTVESTYPDL
HTECPDLYPVLAEDQTVKWVLSRGGRYYKVGDLQQADGNWKFIPDANYQETDSIMNFGKDS
YAAMTYYVQDFGTKANPTIPKIIELNWMNTWDNYCNLVADRLGQSFNGTFNLNLELGLVKE
GDKYVLTQTPVEAYESLRDNDNKVEYKNVVVGKENDLFKDFSGDTYEIVAHFKPSDKTTKVG
FNLRVGSGEMTKVYYDLIAGRIIIDRSQSGIILTELFSNIDSQAVTPNIDGSIDLHIFVDRASVEV
FSKNHTVAGANQIFTSAQSLGLEVLIDGEDAKADIVLYPLKSIWKNKIIDTTPQIVIPASEPKVR
MNVGDSTTVKAYVSPVGASQDLIWNISNPSLVLDQISGNQVFLKAIKKGQVIVRAQSQSNPAV
YQDFIIDILEDNFNTNVKDVNVFSGDWYVDGESLKVANHNSNDIYMSADKIPYENYQMDLDI
KYGRGIVNIFFASGNPDANNAYTIQFGSNNSVRLFRFYRDTIFEAPMIDVINDNQFHHVRLVKS
ANVIHVYVDNEMVMSYTFDQVEEFFNNPYLGLGLWDGELAVQNFYVIDLDAQKPVFVEEHE
KEKLLSELKKSVVKTSSYSTLKTIETSSKTNSENLEAPTVSKKNLPMTSDSNNNLEELGILVIL
TTLGAFLGRVILKKEK

SEQ ID 12

atggctgaacttgaaacacaaaaaactcagttaacttctgcggttaatactacaaaatctcaattagaccaagctaagca
agtattgagtaacttacaagcaacacctcttcaaactcaaaatgctcaatctaaacttgatcaagcgaaagtagagttag
cacttgcacaagataactatgttaaagcccaagaagctgttaaattagctagtcaagaattagttgtcaaagaagctaac
ctaaaaaatgcccaagccgacctattagataagcaaaatatttgaatgaagcacaagcaacccttgcagaaagtcaatt
agtattagctagtttacaatctaaccttaaagaagcacaagcaagtttggcagaagctaaaacatcgttagataccgcta
aaacaaatcttgcacagaaacaagcatacttactttctcttcaaaatgcgcctaaagttctagcagaagctcaagctaaa
cttgttactgctaaaagtgatttagccaaaaaaatggctattttagacaaagaagtagccaaattaaaagaattacaagc
tgttcaagctgaagctcaaaaccaatatagtattgttttgaagcttttaaagcagtacaagaagctaagaaacaagctg
aattaacagaaatctatgagcatattatctcagaaggaggagaagcaataccagttgttgacgaaacaggtaaaataact
ggttatgtagatggtagtaagaaaattgttactaatgaaacgagttttgagctaattagtacagataaatcacctgttga
atcaccagtcaatcaggaaaacaaattagtaagttcttcaactaatgatttaccgaatactggtgaatcaagcattgcac
cattcacagcaattggagcaattatcttatcagttcttggactattagggtttaaaaaacgtcgtacttat

MAELETQKTQLTSAVNTTKSQLDQAKQVLSNLQATPLQTQNAQSKLDQAKVELALAQDNYV
KAQEAVKLASQELVVKEANLKNAQADLLDKQNILNEAQATLAESQLVLASLQSNLKEAQASL
AEAKTSLDTAKTNLAQKQAYLLSLQNAPKVLAEAQAKLVTAKSDLAKKMAILDKEVAKLKEL
QAVQAEAQNQYSIVFEAFKAVQEAKKQAELTEIYEHIISEGGEAIPVVDETGKITGYVDGSKKI
VTNETSFELISTDKSPVESPVNQENKLVSSSTNDLPNTGESSIAPFTAIGAIILSVLGLLGFKKR
RTY

SEQ ID 14

atgacacacatgaataaaaacggacgctacaagcaacgctttagcctccgcaagtacaaatttggtgcagcttccgtcct
cctaggaaccatcttcgccctaggcatgaccggaacaacagcacaggctcaggaaggatgggctggaagtggtctaggag
tacctggcgttggagtacctggcgttggagtacctggcgttggagtacctggcgttggagtacccggagtaggtgtacca
ggtgtaggagtcccaggcgtaggtgtacctggtgtaggagtcccaggcgtaggcgtaccaggagtaggagtaccaagtgg
ttataataatggctttgattatggaacaggttatggttcagggtacgggaatttaggttatcctatgcccgtacctgtac
caggacctatgggccctccgggaatgccaggattgcctggaccagcaggtccgtcaggaccagttggaagaacaggtgag
gctggacaacctggaccagcaggtgctcgcggagagcaaggaccagcaggaccaagaggtgaggctggtgcaactggacc
aagaggtgaagcaggtcctcaaggtaaggaaggaccggcaggaccagcaggtgcaaaaggtgaacaaggtccccgtggtc
aaaaaggtgaaaaaggtgatcgcggacgtgatggattacaaggtttacaaggaaagccaggtaaagatggccgtgatgga
caaaagggagaaaaaggtgatccaggtaaaaatggtaagcaaggccctgcaggacgtgatggcttgaatggtcaaaaagg
tgacccaggtaagaacggtctaaatggtaaaccaggtgctaaaggtgctgatggtcaagatggtcgcgatggtcgtgacg
gtaacccaggtaaaccaggtaagaacggtgctaaaggaacaccaggtcgtgacggtgctaaaggccgtgatggtaaagac
ggtaccaatggtgtagccggtaaaaatggtcgtgacggtgccaaaggccgtgatggtaaagatggcgctaaaggtcaaga
cggtaaacacggtcgcaacggtcaagatggcagacatggacaagacggtgtcgatggccgtaatggtctagatggtcgcc
gtggtcgtgacggacgtgatggtcgtgatggtatcgacggtgtcgatggtcgtgacggtttatcaccaatcattaaaacc
atgacacactctgatggaagccatactatccacttcctcaacccagatggcacacgttcagaaatcacccttcgtgatgg
taagaacggtcaagatggaaaagatggcgctccaggtcgtgacggtgtagacggtaaagacggtgcaccaggacgtgatg
gccgtgatggtaaagacggtatgccaggtcgtgacggacgtgacggtcacgatggcaaagacggcatgccaggacgcgat
ggcatgaacggtaaagatggtcaagcagcagcaggcaacactgctggcaaaggcaatgcttcagacatgaaacctaaagc
tatggcagcacctgcagcaatgactaaccaaaacgctcatgcaaataacaaaggtccagctacagcgcaattgccatcaa
ctggtgacaaggctaacccattcttcacaaccgcagccctagcagtcatggcttcagcaggaatggtagctgtatcacgc
aaacgcaaagaagat

MTHMNKNGRYKQRFSLRKYKFGAASVLLGTIFALGMTGTTAQAQEGWAGSGLGVPGVGVPG
VGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPSGYNNGFDYGTGYGSGY
GNLGYPMPVPVPGPMGPPGMPGLPGPAGPSGPVGRTGEAGQPGPAGARGEQGPAGPRGEAG
ATGPRGEAGPQGKEGPAGPAGAKGEQGPRGQKGEKGDRGRDGLQGLQGKPGKDGRDGQKG
EKGDPGKNGKQGPAGRDGLNGQKGDPGKNGLNGKPGAKGADGQDGRDGRDGNPGKPGKN
GAKGTPGRDGAKGRDGKDGTNGVAGKNGRDGAKGRDGKDGAKGQDGKHGRNGQDGRHGQ
DGVDGRNGLDGRRGRDGRDGRDGIDGVDGRDGLSPIIKTMTHSDGSHTIHFLNPDGTRSEITL
RDGKNGQDGKDGAPGRDGVDGKDGAPGRDGRDGKDGMPGRDGRDGHDGKDGMPGRDGM
NGKDGQAAAGNTAGKGNASDMKPKAMAAPAAMTNQNAHANNKGPATAQLPSTGDKANPFF
TTAALAVMASAGMVAVSRKRKED

SEQ ID 15

atgaaaaagcatattgtgttaaaaagcagtattttaggtcttgtcgctggaatgtcagttttagtatcatctgtacaagc
tgatcaagttgatgttcaaattttaggagttaatgatttccacggtgcactggatcaaactggttcagcttat
atgcctgatggaaaagtgtctggggctgggacagcggctcaattagatgcatacatggatcaagcgcaagcagattttaa
ccaaactagtccaactggaacaagtatccgtgtacaagctggtgatatggtcggtgcaagtcctgcaaattctggattac
tacaagatgagcctacagtccaagtatttaatgaaatgggcgttgaatacggaacactaggaaaccatgaatttgatgaa
ggattagctgagtataaccgtattatgactggcactgcacctgcagctgattcaagcatcaaccaaattacaaaagatta
tacacacattccatcggaccaaacaattgttatcgctaacgtggttgataaaacaactggagagattccgtataactggc
aaccatatgctataaaaaatattcctgtaaacaacacttctgtgaatatcggttttattggagttgttacaacagaaatt
ccaaatctcgtcttaaaacaaaactatgagcaatacaatttcttagacgaagcggaaactattgccaaatatgccaaaga
attacaaggacaaaatgttaatgccttagttgtattagctcatattcctgcaacaagtggtaaagatggtatagtaggcg
acgaaatcgctacaataatggataaggttaaccaattatatcctgacaatagcattgatattatttttgcaggtcataat
caccagtatacaaatggaaccatcggttctactcgaattgttgaagcactatcccagggtaaagcatacgctgatgtgcg
tggtacacttgacactgatacacaagactttatagctacccctactgctcaagttgttgcagttgcacctggcgttttaa
caggcacagctgaaatccaagctattgttgatgaagctaatacaattgttaaacaagtgactgatcaaaaaatcggaact
gccgcaagttcagaattaatttcacgtgaagtaaatgtagataaagaatctgcagtaggaaatctcatcacaactgcaca
attgacagttgctcgtgaaacatatcctgatgttgattttgctattacaaataacggaggaatccgagcagatttactag
taagtagtgatcaaagcattacttggggtgctgctcaagcagttcaacctttggaaatatcctacaaatagttgagcta
actggtcaagaaatatacgatgccttaaatgaacagtatgatgaggggcaaaaatacttcctccaaatgtcaggcttacg
ctatgcatacactgatagtggctcaactgaccctcttgttccatttaaagttgtgaaagcttacaaagacaatggagaag
aaatcgatccaaatgctacttataaattagtcattaatgacttcctatatggtggtggtgatggttttgcaacattcaaa
aaagggaaattattaggagcaattaatcctgatactgaggtctttattaaatatatcaaagacttagaagctgctggcaa
accagtaacagctgcaataacagggttaaaacctatgttacaacggcccttgagccttcaacaactactgatgcaagtg
gtactcatgaaatgatcaatcgtgtttaccgtgatcgtgatggaaaaattgtggctacagaagtcgtttccgacctcttc
actccagctcctgttgaagaaactgaaacacctaaaccagctgttaactctattaagattcctgttaaaacaccaaaata
tggtcaaagcttaacagcagtaaaagcaggtcagcaagcacaaaaagcaagtgacaaaaaacaattgccaactacttcaa
gtcaagaagacacagcaattctactttcattacttggtgcatcaagtctagcaatggcggtagcattaaagaaaaaagaa
aataac

MKKHIVLKSSILGLVAGMSVLVSSVQADQVDVQILGVNDFHGALDQTGSAYMPDGKVSGAGT
AAQLDAYMDQAQADFNQTSPTGTSIRVQAGDMVGASPANSGLLQDEPTVQVFNEMGVEYGT
LGNHEFDEGLAEYNRIMTGTAPAADSSINQITKDYTHIPSDQTIVIANVVDKTTGEIPYNWQPY
AIKNIPVNNTSVNIGFIGVVTTEIPNLVLKQNYEQYNFLDEAETIAKYAKELQGQNVNALVVLA
HIPATSGKDGIVGDEIATIMDKVNQLYPDNSIDIIFAGHNHQYTNGTIGSTRIVEALSQGKAYAD
VRGTLDTDTQDFIATPTAQVVAVAPGVLTGTAEIQAIVDEANTIVKQVTDQKIGTAASSELISRE
VNVDKESAVGNLITTAQLTVARETYPDVDFAITNNGGIRADLLVSSDQSITWGAAQAVQPFGNI
LQIVELTGQEIYDALNEQYDEGGQKYFLQMSGLRYAYTDSGSTDPLVPFKVVKAYKDNGEEIDP
NATYKLVINDFLYGGGDGFATFKKGKLLGAINPDTEVFIKYIKDLEAAGKPVTAAITGVKTYVT
TALEPSTTTDASGTHEMINRVYRDRDGKIVATEVVSDLFTPAPVEETETPKPAVNSIKIPVKTP
KYGQSLTAVKAGQQAQKASDKKQLPTTSSQEDTAILLSLLGASSLAMAVALKKKENN

SEQ ID 16

atgaagaagaaacaagaaatgaagtactacctcaggaaatctgcctatggcttagcagccgtatcagtagcagtcctcgc
agtcggaagtccggtatctgcacaggagaaagctgcaagcaccgaagctaccccaaaggtagcaccaaaagttccagaaa
aaccaagtaaagaagttataaaaaaaagctttaaagaaaactgatgaagaaacaaaagaaaaagagaaagaagccaaagaa
aaagtagaaaattctgaagaatcaacggctatggtttcagagctatcttccaccaatgaggaaacatcctctgaagaaga
gaataatactgatgaagaggaaacagatggtttagaaagtgaagaatctgaagaaacagaatccgaagtcaaagaagaat
ctgaagaagaaaaagaggatgacccatccgaatcagatacagaagttgagaatgttgaagcgattaatctttctgaagct
gagggaaatgactcatcaaaacctgaaacttcagaagaggtaactgctgaagaagaccgtcaagagactgatcggcttgc
agaagtcaaaacagaggagagtgccaaagaaggtgatgaagatgctgataaaaaagatgaggctgaagaaaaagccaaaa
aaggagctgaattaagccgtgtgaaagcagaagcactggctaaattagaagcacttaatgctagtcgtttgatgaagaaa
attgttgaatcgggcaaaacggtagaaggcatcctttccttcatgaaggaaagcttacctcaactggaagctgctagagc
atctgaacaagctaaagctccggaagtaactcaatctcctgatcacttaccaagtgagaaaaaagcagtccacaatccag
tccaagtagctaaaagaagtgaaagcttggaacagaaagctgaaaatgctaagacaagcacaaatcttcaaaatactcaa
attccagtacaagaggcaaaaagaactcaagcccaattgccaagtacaggagaagattaccaagcttatcttgtggccgc
agcaatggcccttattgcctcatcaggcatggtggcctatggcagctatcgcaagaaaaagcaaaaatag

MKKKQEMKYYLRKSAYGLAAVSVAVLAVGSPVSAQEKAASTEATPKVAPKVPEKPSKEVIKK
ALKKTDEETKEKEKEAKEKVENSEESTAMVSELSSTNEETSSEEENNTDEEETDGLESEESE
ETESEVKEESEEEKEDDPSESDTEVENVEAINLSEAEGNDSSKPETSEEVTAEEDRQETDRLA
EVKTEESAKEGDEDADKKDEAEEKAKKGAELSRVKAEALAKLEALNASRLMKKIVESGKTVE
GILSFMKESLPQLEAARASEQAKAPEVTQSPDHLPSEKKAVHNPVQVAKRSESLEQKAENAK
TSTNLQNTQIPVQEAKRTQAQLPSTGEDYQAYLVAAAMALIASSGMVAYGSYRKKKQK

SEQ ID 17

atgactaaaaatcgttctagtcattctacctatgctgataaagtgattaaaggactatcagcttcatgcttcatattagg
cgcattcgtttttgcacaacaggttagtgcagaagaagtggtaactgctacaaacacgtctttaactgcaccaaccgtta
caacagtttcaccgctgacaaatacggatgtttctgctactgcggtcgctgcagattccattgcaagcccagtaacgact
acagatagtaatctcaattcagctccaattatagatacaagcaatccatctaatataactagtccaacagataccaacac
ttcaacaacttcatctgacacgacttcatcacctatccccgtaaccttaaataaagcagcaattgctagcccaacaagtc
aaacggaaaccctagcaagccaagaaatttacatggataaggtcaatcaagtgaccataaatacaacagtaaatccagca
actccaatgacctggacgattgaaaattatcctaatcaaacctataatatgcaaaccggtgattttactggatctccaag
ttatacagttacatcaactagtccaaataatagtagtgttcaaattgaaattccgccacttttttggaacagatttaagtc
tacgttggccaaacaatatcagacgtacttaccgtgattatatgggttcctatacacttaaagggatcagtgaagatggt
cttaccattgtcaccaaagaattgattctacgaccttatgctgattacatgacacatgaggaactgctaaatgaattaaa
tgctattgaagctaatcatgcaacagaccgtttggtaacaatagaaacaatcggtcaaagtgctttaggaaatgctatta
aaatgggaattgtagctaaagatcaagctagcttagatacctatttaaatcaaacaaccccaatgatgttgatggatcct
gaccaagcattgaatctcttagcacaaggaaaatttgattataaactccctatcttaatcaataatacccatgcggatga
acagccaggaattgatgttgttcgcggtcttttcaaaactttgcaacagagtcagttatcaactatcaaactgttgatg
ccgctaataatccaacaacagtacaaattgatatcaaagctctcttagacaaagtcatcctacttttcaacttcacagaa
aatcctgatggagacattgccaatacacgcgcccttaataacggattagatccaaaccgggatactggctatcaaaccaa
tccagaaacccgtgccattgttgaacaaattaataagtggaatcctatttcaatttttgacgtgcatggctttgttaaag
aattcttgattgaaccatgtacaccaccacatgatcctaactttgagtatgatttatttgatgcaagtctcgttgaaggt
gcacgagaaatgggaaatgccggcatcacaaactctgtttacgacagctacatcataccaaaatttgattatggttcagg
atgggatgactccttctcaggatacacagctgtttatggattgtatcaaggtatcttaggacataccattgaaattccag
aaaccaaccaagaatcctataatgcgggctacttcgcagtcttagcaggtattaattatgacttggcaaatagtgaccag
ctaatgaaaaataagttaaccttctttctcgtggtatccacaaagcagaagtggctgccgctgaagaagcattgcttac
agtagacggctccgtgaaaggtagaattaaagatggtcacgatacctttcttcccagattattatatgattccaatgacat
tatcaactgaaagtgatactgaccaagctttcaagatgattgattatttcagaagaaatggggtcattttaaatgaatta
acagcggatgttgctggttatcataaaggtgatttagtcattgacatggcacaagctaaaagaggatttgctaaccatgt
tctctacaaaggagcaaatgaatctgaatggccagctatgtatgcagaattagtgatgaatttccctgcaatgcgtggct
ttaaagcagatgccatttacgctgatagtttatttgctggaaatcttggagcagttactttaacaagtgccccaagaacc
gcgcctagtgataaagaatactatattgtttcaaataattcacttgcagcagtccaagctgtcaatgctgctatccgtgc
aggaaaaaatgtttatttgaccaatgatggatatgttatggataaagccacttatgaaagtgtcattggtacataccat
tatttgctcaagcaacctgtatgaaaccagttggtgacactttgaaagctatcaaagtatatgcacctggaaacccaaac
ctctatttaggatttaattcaccatcagaagtcagtcttgctctaaatcaaatgggatttgatgtggttccttcagtaga
tcaggctgatgtcatcgtgttagacaatgatcaatttgacgcaagtattttaggtaaaaaacctgtcatcattttaggtg
gctctgcaatggctaagttagaaagtttgggtatcttgacaggttttgatgctgccatgactagcgaaagcgatggatca
agttatgaaggacttatgaaaatctctctagatgccaatagtccttacacgagtggctatgcagcaaattctttatacta
ttctaactcaggttcttggattgaaggagtcccaacaggatttatgacactagccaatatttctgcaagtgatttctatg
tttcaggatggtggccaaatcatgaaggattagctaataaaacagttgctattagtggtctttatcagggacaaccaatg
tttatcttcgctggaaatccagtgaataagactcataccattaatttctaccgttgggtgagtaatgctatttttggaac
aaacttaaccagcttcattgaaggtcaatgtactattccaactgactctgaaacacaagttgtaagggttaaccataatg
gtcaaacagtggcagtttatcaacaagtggctaataaggaagttaatgggacagttagtcaaaatagcttgccagcatta
gctgatggcagtcacaaagatgacagcaaactcttctgggtaactggattattggttgcaagtgggggattatttgcagc
tcttaaacgccgtgaggaagac

MTKNRSSHSTYADKVIKGLSASCFILGAFVFAQQVSAEEVVLAYNISLIAFIVFTVSPLINIDV
SATAVAADSIASPVTTTDSNLNSAPIIDTSNPSNITSPTDTNTSTTSSDTTSSPIPVTLNKAAIASP
TSQTETLASQEIYMDKVNQVTINTTVNPATPMTWTIENYPNQTYNMQTGDFTGSPSYTVTSTS
PNNSSVQIEIPPLFGTDLSLRWPNNIRRTYRDYMGSYTLKGISEDGLTIVTKELILRPYADYMT
HEELLNELNAIEANHATDRLVTIETIGQSALGNAIKMGIVAKDQASLDTYLNQTTPMMLMDP
DQALNLLAQGKFDYKLPILINNTHADEQPGIDVVRGLFKTFATESVINYQTVDAANNPTTVQI
DIKALLDKVILLFNFTENPDGDIANTRALNNGLDPNRDTGYQTNPETRAIVEQINKWNPISIFD
VHGFVKEFLIEPCTPPHDPNFEYDLFDASLVEGAREMGNAGITNSVYDSYIIPKFDYGSGWDD
SFSGYTAVYGLYQGILGHTIEIPETNQESYNAGYFAVLAGINYDLANSDQLMKNKLTFFSRGIH
KAEVAAAEEALLTVDGSVKGRIKDGHDTFFPDYYMIPMTLSTESDTDQAFKMIDYFRRNGVIL
NELTADVAGYHKGDLVIDMAQAKRGFANHVLYKGANESEWPAMYAELVMNFPAMRGFKAD
AIYADSLFAGNLGAVTLTSAPRTAPSDKEYYIVSNNSLAAVQAVNAAIRAGKNVYLTNDGYVM
DKATYESVIGTYPLFAQATCMKPVGDTLKAIKVYAPGNPNLYLGFNSPSEVSLALNQMGFDVV
PSVDQADVIVLDNDQFDASILGKKPVIILGGSAMAKLESLGILTGFDAAMTSESDGSSYEGLMK
ISLDANSPYTSGYAANSLYYSNSGSWIEGVPTGFMTLANISASDFYVSGWWPNHEGLANKTVA
ISGLYQGQPMFIFAGNPVNKTHTINFYRWVSNAIFGTNLTSFIEGQCTIPTDSETQVVRVNHNG
QTVAVYQQVANKEVNGTVSQNSLPALADGSHKDDSKLFWVTGLLVASGGLFAALKRREED

SEQ ID 18

atgaaatcttatttgaaacgtcgttacggtctaatcacaacttctgttcttgccgcaactgtattagctactggttggca
aagcacttctgttttggctgaaaatcccacaacatccccaacaaccaccgtcactagtaatggttttaactttaatgcaa
ctcttctagatcacaatggcaaaacagtttccgggaaaacagttagtctctatgatattactgatggtaacagaactttg
gtgcagagtgccgtctctgaccaaaatggtatcgcatcatttcccagttgccactcaaccgaaatctatccgtttttgt
agataatgtcgctcaaggctacacaacacgtactagtgaaagtggacaagtacgctcctctgccttttatattgatggac
agggaacaaacacaccaaaatacagtgataagacaatcactattagtgtcctaaatgaggaagctgagccacttgccaat
caaaaagtaaccttaaccaatcccctaaaagaggttgttggcgaagcaatgactgatgcagatggtcatgttgttttcaa
ggataaacttttagaaggtgtcttttacaactatgctgtcaacggaaaagcaattgattctgctcagccagattcaaaaa
gaagtgtcttttagagtccaatcaactagctaaagaaggatttactttcacagcaactattttaggaaaaaacggcaaa
actgtcgctggtaaaaccgtaagtctttatgacattactgatggtaacagaactttggtgcagagtgccgtctctgatca
aaatggtatcgcatcattttctcagttaccactcaaccgaaatctatccgtgtttattgatgatgtggctcaaggctaca
ccactcgtaccagtgaaaatggacaagtgcgttcatctgccttctatgtcgatggacagggaacaaacacaccaaaatac
agtgacaaaaccattacgattagcgttcttaatgaggaagtgaacctctagctaaccaaaaagttaccttgatcaaccc
cctaaaagaagttattggtgaagcaaatacagatgcaaatgggaaagtcatcttcacagacaagctattagatggtgtct
tttacacctatgctgtaaatgatcaaacaattgatgctactcaaccagatacaagccgtaatgtctttttaagagctgat
caaatcctgaaggaaagccctaaaaatacagcaagcgaggctgctactaatttggaaaaaaccactgaaagcaaagaagg
taacatgcctcagcaaaaccaatcagaagcaaaagaaaaggctcctgaaaaacaagtcgatgctaatgctgccaacaaaa
aagcgccaggtcatggagaagccaaaaaaggcctaccaatggctggagaaagaggaagtcgcttgttcacctttattgga
ctttcacttattttaggaatagccggttacttattgaaacataaaaaagtcaaatcc

MKSYLKRRYGLITTSVLAATVLATGWQSTSVLAENPTTSPTTTVTSNGFNFNATLLDHNGKTV
SGKTVSLYDITDGNRTLVQSAVSDQNGIASFSQLPLNRNLSVFVDNVAQGYTTRTSESGQVRSS
AFYIDGQGTNTPKYSDKTITISVLNEEAEPLANQKVTLTNPLKEVVGEAMTDADGHVVFKDKL
LEGVFYNYAVNGKAIDSAQPDSKRSVFLESNQLAKEGFTFTATILGKNGKTVAGKTVSLYDIT
DGNRTLVQSAVSDQNGIASFSQLPLNRNLSVFIDDVAQGYTTRTSENGQVRSSAFYVDGQGTN
TPKYSDKTITISVLNEEGEPLANQKVTLINPLKEVIGEANTDANGKVIFTDKLLDGVFYTYAVN
DQTIDATQPDTSRNVFLRADQILKESPKNTASEAATNLEKTTESKEGNMPQQNQSEAKEKAP
EKQVDANAANKKAPGHGEAKKGLPMAGERGSRLFTFIGLSLILGIAGYLLKHKKVKS

SEQ ID 19

atgtctaagccaatgacaaagaaaaaaaaggctatttctattcaaaagtctgtaaaaccaattttaggttttaccttcggagccctattatta
tcaactgtttttacaccttccgtatttgctgaagaagtagtgtcttcattagggcacgcaacaagtggtttgctgtctgtatcagttcccaaaga
attaaccagtcttgagacaacgacctacttaatggcaagtgagtctccaagtaacactctaacttcggataccatttctagtgataatggagg
gacggcttcaaatccaaatgaaatagtaaccacagagacaaccagcgaggcgattcctttcgacacagaagtcattcaaaatccggattta
cctataggtgagattaaggtagttcaagaaggagtagctggtgaagtaacggttacaaagacaaccacaactattactctaaatggtgttt
ctcagtcaactacaactgagtcaagggtacctgtcaaaaaacctattaataaaattattgaagtaggtacaaaagagattagtacaagtcc
aagtagttctgatgttattacagtcagtccatcaccctcttcaacttcatcagagtctaatcagcaaggttcgttaactccggccccctaaatcac
gtcaaaatagtcaggaaaagaaaggtagtcagactaaaaaatccaaagatgacgccaaagaaaaagagggtgataagaaagaacttc
ctccaactggctcacaagaaagtggtatttttttctctatttctgcacttattagcacagctttaggtcttttcctattaaaatcaaataaaaatg
at

MSKPMTKKKKAISIQKSVKPILGFTFGALLLSTVFTPSVFAEEVVSSLGHATSGLLSVSVPKEL
TSLETTTYLMASESPSNTLTSDTISSDNGGTASNPNEIVTTETTSEAIPFDTEVIQNPDLPIGEIK
VVQEGVAGEVTVTKTTTTTTLNGVSQSTTTESRVPVKKPINKIIEVGTKEISTSPSSSDVITVSPS
PSSTSSESNQQGSLTPAPKSRQNSQEKKGSQTKKSKDDAKEKEGDKKELPPTGSQESGIFSLF
SALISTALGLFLLKSNKND

SEQ ID 20

atggaaatcaaacaaaaacatggcaagcatgccttacgcaaagcggtcaccgcagcggtcttagcagggacagctttctcaa
gcctaggaggattcgcaggagcagtcacaacagtcaaggcggaagatttatttactataaataattcagaagtccaagataa
gttagaatcaaaggtaaaacaacttttggaagcccaacgaaaaggagaagacattagcgaaaaactacgagagttattaag
tgaacttccaaccgatattttaaaggatattatgctatcaaatattgaagctgactatcttttaggatttctaaaaccagctgttg
aggaaatggtgagaagatctgaacaaaatgacgagcgttggaaagatattacagaaaaaacactagctttagaggctttaa
aagattcagaaagagaaattaggaaagaaaaagagaaacttgaggatgaagttcaacttgcaaaggtaaaaatagaaac
taaagaatcagaattaaatgatttaaaaaaagattatattgatactagggaagaattagcagatactattgaagaactagac
gaagttaaaaattcaattgtagaaaaagaagcaaaagttaaaggcttagaagaaaagttacgtgatttagaaaaagaatt
aggtgactacgataaaaaattaagtgaagctgctaagcaaaattcagatttatcaaatgaaaacaaagagttgaaagaaaa
cttagatactgctgagaatattactgttgaacttcagaaaaaatctcatgaattggaaaaaactaaaaaagaagttgaatta
gagctgaaagcagaaaaagaagcccttgaggcagaaaaagttaagttagcagaagctaatgaagcaaatgataaactatc
tgaagaacgtgatgctgccaagaaagaagctgaaaaagttcctgaactagaagggcaagttgaaaaattagttgaagaaat
cactgctgctaagaaagaagcagaagagcttcaagctaaagccgaaggccttgaaaaagacttcgaagctgttaaagcaga
aaaagaagcccttgaagctgaaattgctaaattgaaagaagaccaccaaaaagaagtggacgcgcttaatgctctccttgct
gataaagagaaaatgcttaagagcttacaagaacagcttgacaaagctaaagaagaagct
atgaagaacgagcaaatgagccaagaagaaaaagctaaattgcaagctgagttggacaaagctaaacaagaattggcag
aaaaaatcaaagacatgccaaacaaagtggctcctcaagccgaaggcaaagccaatgcaggtcaagcagctccaaatcaaa
accaaaacaaccaagcgcaagcaaaccaagctaagaacgcaaacaacctcccatcaacaggtgacaaaccagttaacccac
tcctagtggcaagtggtctctccctcatgatcggagcaggtgccttcgtctacgccggcaaacgcaaaaaaggttaa

MEIKQKHGKHALRKAVTAAVLAGTAFSSLGGFAGAVTTVKAEDLFTINNSEVQDKLESKVKQ
LLEAQRKGEDISEKLRELLSELPTDILKDIMLSNIEADYLLGFLKPAVEEMVRRSEQNDERWK
DITEKTLALEALKDSEREIRKEKEKLEDEVQLAKVKIETKESELNDLKKDYIDTREELADTIEE
LDEVKNSIVEKEAKVKGLEEKLRDLEKELGDYDKKLSEAAKQNSDLSNENKELKENLDTAE
NITVELQKKSHELEKTKKEVELELKAEKEALEAEKVKLAEANEANDKLSEERDAAKKEAEKV
PELEGQVEKLVEEITAAKKEAEELQAKAEGLEKDFEAVKAEKEALEAEIAKLKEDHQKEVDA
LNALLADKEKMLKSLQEQLDKAKEEAMKNEQMSQEEKAKLQAELDKAKQELAEKIKDMPN
KVAPQAEGKANAGQAAPNQNQNNQAQANQAKNANNLPSTGDKPVNPLLVASGLSLMIGAGA
FVYAGKRKKG.

SEQ ID 22

ttgcgatataaaaaaatgacgagatcgtcaaatagcagaatagttttacaatcgacactgattatgatttttgcttcaagctgtgtaaaccat
tttaaaggaacaattcatgcagatgaaaaagtgattaatggttcagaagcttcaatccaagttgattatacattgaatactgcatctgaaaa
cagacaaattccagaagaaaaggtaactgaggaagctacaaatgatcagccggaacttttagagaagcaagcggcatttttacatgaagg
ccgtgaaaaaaatactgagaatttgccttagatggtagaggaagtctgattgctagtattgattctggagttgatattaagcacgaggcat
ttgcaaataatgatgataaccatgattttcataaagagacagaagtttctgaaggttctacttcaaaaattccctttgtttatgatttcttagt
ggtgataccagtgtgagagatgacgaagaagaacatggtatgcatattgcaggaatcttagttggtgattctaaaaaaggtttcaaaggg
atggcacctaaagcacagctaattgcatatcgaacttggagtaaaaataatagtgaaggttatcaagaagcaaaccagttttttgcaatga
aagatgccatcaaacgtggtgctgacgtgattagcttgagtattggtgagattggtagtgggcaaaacgatgatatttgggcaaaggtatt
agaagaagcgaaaaagaaaaatgttgttgtcgttgcagcaatgggaaactatgggacatcagcaacaagtaatacttttgatcaagttgtt
gatgaaacttcccacaaaccgatagttccacttgctttctgtatctgcaaatcccgaagtcattggtgttggctctatttttgaaaaagaaat
gtatttaccaacactaaaaattgatactttagaagtaccttatgaaaatatcaactggcaaaattattacctttttaagcaagaaaagcaag
aacgtatttctttttaatgaaatgttaataaccttaaaccaatcaaaagaagaaggaagtttaaaagataaagttgtcatcatagaacgtca
agcagaaaatatttttcctcaattaaaagaagtgatgaaaaaaggtgctaaaggtgttatttgattaaccaatcaggaccaactacttatg
gtaac
tatgagacagttccagaattaagaaatacccttattagatgatgaagatggtgatttcaaaaaaacatgggctgttagcatttcagcaaacg
atggtaaagcattgaaagattaccttcaaaaacaagacaagaaaaaaagctattcacttgtgtttaatacaaaaccacaattgaaacatg
ttttcaaatatccaggtgtatcaggttttagtacttgggggccaggtcttgatttaacccttaaacctgatatagtagcaccgggagaaaatat
ttattctacaggtaatgataatagctatttttattagtagcgggacttcaatgtctgctccaaaagtcgcagggcaagtgccatgtttctccca
gtgacaaaaaaaatggcaaaaaaaatgggaaaaacaaaatgtttccatgtctataccacaattaacgaagttattgttccaaaatacagcg
gatattctttatgatcatagtgtcccaaatggtaaacctatattaccttactcacctcgaagacaaggggcagggggctttaaatgtgaaaaaa
gcagcacagacgaatgtttttgtaacttctgcagataataaaggagcaatactgttaaaagattttaaagaaagtcgtaaagagtttgata
ttgtgatcagaaacttttcggatcaagtcagacgctttaaaattgaaccaggatcagttttaggaaagattctttattcaaaagacagaaaa
aattatgataaaaatgagactattcaaaccgtgcactctagggttattaaagattcggccattgagagtccattatatgttcaaatagctcca
aacagttcaatgattcttcctctaaaacttaatgtgggaaaagcagttgaaaatgaatttgtggaagggtttataaagcttcgctcattaga
gaaagatcaaccggatttaaacattccattcatgggattttatggtgattggaactcagaaaacattttagatccagtagcctggcaagaag
gaagcaagactcgtttaactggtatcgttcatccatatggtttaggagaagataaatttgatatcgtgccttgggggttgactatgaaaaat
ggaagcaagaccctaaagctttagatgcagatcaacggttttatgttatgcagagtcaggctggcattgccaaccatgctaaaatgcgtcta
cgt
ttaatatttatgcgacatgctaaggattaccgtgttgatatcctaaattctcaaaaagacaaggttttaaaaaccttaaaaacaggtcatcag
gcccctaagtatatggaaagtgcattattagaacatggagatcaatatcaaatgcaatttgcagattttgatcctgatttagaatgggatgg
aagtgtctataatcctaaaacaaacactgaagacccctacctgacggaaactattttattcgggtttcctccagaatcagtaaaaatcgtcc
atatcaagagcatattattccctttgccattgataatcaaaaacctaaagtaaaaattgaagaaaaaactgctcttcaagttgttttcatgtt
gatgatgctcaccttcaaggaataaggctagtaaaagataataagattattcaaaccttagaaacagacactcaaggaagatttcgactta
atcttgctgatttccaaggtaagggatttgaattagaggctatagatttgcagaaaataaaacaatcatagatttagattctcttaaagaa
aaagaagtaggatatttatttggcgcaagtagtagttataacaaatccaggtatcgatcaccaaggtcagtagcccataaaaatgctgaag
atattcttcatgagaattcagaggaaagtgaggagatagcatcagcattaacttttgaagatgggagtgattttcacgatggtaagaaaac
aaatgcgtattcagagattaacaaaagtaatgataatagtgtccatttaaaagataatacttattatcgtgactattatatccatttaaaag
aagggcaacgtctttagttaccacaacaaatgcatttcataatagtaaacaaggaaatgatatcacagcgccaacatggcaagctaacta
tacttatgatccttcgacaaatcagggacaatattatcgtaagattgctattccgatttatcaaggatcaaatactataaatgtaaaagcatt
ttataaggataaattaatatttaataaaggatacgcggtaaaattagatacagaagttcctcaattaactttgataatccaaatattagctt
tacatctgataaatggcaaaacctatctgatgatgagtatgatgacgataatattgttggtactatcacaattccaaataataccttaagatt
a
tccgggaagattcgagacggtctagatggatggagaatgtttattaatggagacatggtcgatagtgatattaaactaggtgaatatgatg
atatttttcaacaaaatagaagacaatggaaatatgaaaaacaagttgaaaatgatgactatgtgctcataaaactgagtgatcatgttta
aaaacagccgaagttacctctttaaagtaaaaattgatcctactgtttcagagtatcatttcacaaataaaaatgacattattgatgatgac
aaaacattgttaacattaaacaccttaaccgatagctcattgggatatgctaataaacttttaaatatgccaaaagatttggttaaatcaac
agatgatctttttaaagccatgacgatgttatttaaaaaggaaagttttttccttatccgcttaaaaatgatttaaatactaatggaattagt
atgatgacaagtttggtgcagttccaagcaaaggatgttaaagagaatataccattagaatgggaaataaaaaccaaagcatccgactca
aggcagcttcttttatcaaaatcttaagaacgaaaaagaaaggttggatcaggtttccactaatccactagctcatcaattacctctggaaaat
tctaatcaagaaaatggacaagacgctattttgacaagtacaaaagtcttaccaatgtccaaatcatctatattcagagactcgttacgtga
gacgagtctgccagaaactcgtgactcttcatcaatggcaaattggtcattagctttcttcttatctgcagtgatatgtttctttaaaggaagaa
gaaaaagactgaataagtta

MRYKKMTRSSNSRIVLQSTLIMIFASSCVNHFKGTIHADEKVINGSEASIQVDYTLNTASENRQ
IPEEKVTEEATNDQPELLEKQAAFLHEGREKNTENLPLDGRGSLIASIDSGVDIKHEAFANND
DNHDFHKETEVSEGSTSKIPFVYDFLSGDTSVRDDEEEHGMHIAGILVGDSKKGFKGMAPKA
QLIAYRTWSKNNSEGYQEANQFFAMKDAIKRGADVISLSIGEIGSGQNDDIWAKVLEEAKKKN
VVVVAAMGNYGTSATSNTFDQVVDETFPQTDSSTLLSVSANPEVIGVGSIFEKEMYLPTLKIDT
LEVPYENINWQNYYLFKQEKQERISFNEMLITLNQSKEEGSLKDKVVIIERQAENIFPQLKEV
MKKGAKGVILINQSGPTTYGNYETVPELRNTLLDDEDGDFKKTWAVSISANDGKALKDYLQK
QDKKKSYSLVFNTKPQLKHVFKYPGVSGFSTWGPGLDLTLKPDIVAPGENIYSTGNDNSYFIS
SGTSMSAPKVAGASAMFLPVTKKWQKKWEKQNVSMSIPQLTKLLFQNTADILYDHSVPNGKP
ILPYSPRRQGAGALNVKKAAQTNVFVTSADNKGAILLKDFKESRKEFDIVIRNFSDQVRRFKIE
PGSVLGKILYSKDRKNYDKNETIQTVHSRVIKDSAIESPLYVQIAPNSSMILPLKLNVGKAVEN
EFVEGFIKLRSLEKDQPDLNIPFMGFYGDWNSENILDPVAWQEGSKTRLTGIVHPYGLGEDKF
DIVPWGVDYEKWKQDPKALDADQRFYVMQSQAGIANHAKMRLRLIFMRHAKDYRVDILNSQ
KDKVLKTLKTGHQAPKYMESALLEHGDQYQMQFADFDPDLEWDGSVYNPKTNTEDPLPDG
NYFIRVSSRISKNRPYQEHIIPFAIDNQKPKVKIEEKTALQVVFHVDDAHLQGIRLVKDNKIIQT
LETDTQGRFRLNLADFQGKGFELEAIDFAENKTIIDLDSLKEKEVGYLFGASSSYNKSRYRSPR
SVAHKNAEDILHENSEESEEIASALTFEDGSDFHDGKKTNAYSEINKSNDNSVHLKDNTYYR
DYYIHLKEGQRLLVTTTNAFHNSKQGNDITAPTWQANYTYDPSTNQGQYYRKIAIPIYQGSNTI
NVKAFYKDKLIFNKGYAVKLDTEVPQLTFDNPNISFTSDKWQNLSDDEYDDDNIVGTITIPNN
TLRLSGKIRDGLDGWRMFINGDMVDSDIKLGEYDDIFQQNRRQWKYEKQVENDDYVLIKLSD
HVKNSRSYLFKVKIDPTVSEYHFTNKNDIIDDDKTLLTLNTLTDSSLGYANKLLNMPKDLVKS
TDDLFKAMTMLFKKESFFLYPLKNDLNTNGISMMTSLVQFQAKDVKENIPLEWEIKTKASDS
RQLLYQNLKNEKERLDQVSTNPLAHQLPLENSNQENGQDAILTSTKVLPMSKSSIFRDSLRET
SLPETRDSSSMANWSLAFFLSAVICFFKGRRKRLNKL

SEQ ID 23

gtgtcaaaaggtcaatctgatttaagccatgcggaacaaggtgttgatgatcaaattacaattgctaaaaaagatagtatctcagtaacaa
ctgattcaaaagatttaacgccaaaatacattgatacaaaagggttgactggttcagctttaacaacagcaatggaaaaaaacattgcact
gtataatcaagcggttaatgatggcgtaggtattatggatgcttcaagcgtccaaatgaaaaaacaaattgctgattatttaacagctttga
caaattatcaaaagggtgtttcttcaaatacaggattacaatggcaaaatagtgttgtcttagaagcgggctcaggtgcaagtagacaaac
aggcactgaaaatgttgttgattttagtgatggaacgattaaagcagcaggtatgtatgcgacacaaggtcaaaatttagaccaaaatact
gatgcaaattttgataatatttttaagattgagggaaccgggattatttgggtaaagaatacgaccaatggagatgttaaattgactttctct
gaaattaatagtccatacaatacaggtacttacgttgctatttggggtgatgacaaaggtggtattgcttggtcagtctttgccttatactatg
gtggtgcgagtggtggagctggtgaaacaggttctaatacaggttctggtatcagtggtcgcattttaaattatgtgaattcatataaagcaa
cagtagaaacaacaagaggtgtttcagttgtaacttttaatgacattgataatcaacagacagttaaaatgtcgggacttgataatgccaa
agtaacaacaggtgagaatattaatcagacaggaaatgattttgttgcaggttcgggtgacgtttctcaaagttcagcaggagttttaggaa
ccaatggtgttaaatggacttttacaagtgctgataggcgtttattctcatttactcattctacagcaggaactaaaaacacatcaatcgtagg
tggtatttttggatcagcgtctaacgtacctcaaaagccagtaattcctaaactaaccgctcataaagcaatcgttacaggaccaaagggtcc
aagcatccctgttaatcaaaaagtgacggttcattactataaggtttcggttacacctacaccagaaaatccagttactccacaaaaaaaca
tt
acttataaaccaattacaaccactccacaaacaccagtaagccaagcaaatgtgggacttccaacaactggtgataaagcagatggttcta
ttgttcaaatggtaattggtgcattaatggtatcatttgttgggttttcagcattaaaagatcggaaaaaagaaaaa

MSKGQSDLSHAEQGVDDQITIAKKDSISVTTDSKDLTPKYIDTKGLTGSALTTAMEKNIALYN
QAVNDGVGIMDASSVQMKKQIADYLTALTNYQKGVSSNTGLQWQNSVVLEAGSGASRQTGT
ENVVDFSDGTIKAAGMYATQGQNLDQNTDANFDNIFKIEGTGIIWVKNTTNGDVKLTFSEINS
PYNTGTYVAIWGDDKGGIAWSVFALYYGGASGGAGETGSNTGSGISGRILNYVNSYKATVETT
RGVSVVTFNDIDNQQTVKMSGLDNAKVTTGENINQTGNDFVAGSGDVSQSSAGVLGTNGVK
WTFTSADRRLFSFTHSTAGTKNTSIVGGIFGSASNVPQKPVIPKLTAHKAIVTGPKGPSIPVNQ
KVTVHYYKVSVTPTPENPVTPQKNITYKPITTTPQTPVSQANVGLPTTGDKADGSIVQMVIGAL
MVSFVGFSALKDRKKEK

SEQ ID 24

atgttaaaaaaacaattattagtcctaacttgtgtttcaactcttggactagtagggaccacagcttttgctgaagatgtagtcccggtagatc
caactaccccatcaacagaagtgattacaccatcaaccccaatagatactggtttaccgtctgatactactgaccctagcactccggttgaacc
cgagactcctactaatcctactaatcctagtactccgatagatccaggaactccaactgatacgacaacgccaacagatgatacaacaacac
ctggaacatctactagtccctcagattcagagtcaactaacacaaatccaggcacaaaaccaacagatgaagtaaaaccagttaccccatct
actcctgaagtgccttcaactgttactccaggagtagttgataatgttgataaagaaacaggtaatattaccattaaaccaatcccaattagc
ccagataaaacagttgttgggactcagaatgggaatgtgcttattcaagatcgctcaggaaggtatttagtatctgctagtgaacttggtggt
cgacttaatgatgatggaactgtaacaatcaaagattcggaaggaaaagaaaaaacacttcctcatacaggtgaagaaaaaggatttta
agtatcattggtggaacaatcttatcttttgtagccttcttattcaagaaaaaaataactttaaat

MLKKQLLVLTCVSTLGLVGTTAFAEDVVPVDPTTPSTEVITPSTPIDTGLPSDTTDPSTPVEPET
PTNPTNPSTPIDPGTPTDTTTPTDDTTTPGTSTSPSDSESTNTNPGTKPTDEVKPVTPSTPEVPS
TVTPGVVDNVDKETGNITIKPIPISPDKTVVGTQNGNVLIQDRSGRYLVSASELGGRLNDDGTV
TIKDSEGKEKTLPHTGEEKGFLSIIGGTILSFVAFLFKKKITLN

SEQ ID 25

atgaattcaaacacaaaaggacatggttttttcagaaaatcaaaagcatacggtttagtatgtggaatcgcactagcaggtgcttttgctttt
agtggagggaatgtatcggcagatgaagttactgctccagcagaacgtcaaactgttgtaacaacctaacagagccaacaaataaccaa
gcacaagcagttacgtcagaagcacttaatacagcagtttcaacagctaaagaagcaggagtaactgttaacacaacaggagcagttagt
catacagatgttccaagtgcacaatctgatttagctagtcaaacacaaactgttaaagatgcgactgctaaagcagaagctaatacacagg
ctattaaagatgcgactgcgcaaaatgctcaaattgatgctcaaaatcaggcagaagctacacgtgttgctgaaataaataaagcaagtca
acttgcggttgatcaaaaaaatgcccaaggtcaagcactcgttgataaacaaaatgctgatgcacaagcacaagcagatgcgacaaatgc
acaacttaaagcagattatgaagctaaattagctgaaattaaaactgttgaagactacaacaaagcagtagctgaacgcaatgctttagct
aaacaacaagcagatgcgacaaatgcacaacttaaagcggattatcaaactaaacttgatgcatataacaaagcgttagctgataaaatc
aatctaatagctaatgatgttacttttaaaggttatggtaaatcagaagatttaaatgcttatggtatagtaacttctgatactataacaatt
gatggtgcaggaaactttatattaaaagaaccaatgtctgatccaacagggttattggttatatcactacaaaaggtaaattaaactattc
tagtgtttatgatccaacacttaataaagcgaatattacgattgattcaattactttaaatacatggcagttagatttgaatcgcccctcaattt
caggaaatactaatgcatttgcagaatacattgggttagacggaacttcgttatttaagcaagcttatacaggtctaacctcaatgtcaccga
ttactatcggtaaaactagtcaaattggaaagacattcactgtggcaagcgggaaacaacaccagaatttatgttcttgaaaacaaatcc
gttctgggag
tttttcgcaccatcttctttattgcggaattaacctataatacagcaccattaccaaataaacctattgaaccaacattggttactgttacccca
gaagcacttaaaccagttccacaaacacccccaactccagtttatgtgacaccaaatctcaaatccttcacacctgaagtttacaccccaatca
aaccaactgttaaaccccacgttgctgtacctgataaattagttgtcacagtatcagtacatcctgttgtggttccagttgcgaatccttctaaa
gacgttgtagatcaagcaggtaaatcaattaatggtttatcagtgttacctaattctgacttaaactacgtggctttacaagactttagtcaat
ataagggaatgagtgcttcacaagataaaatgccaaaaacttttatctttattgatgactacaaagatgaagcactagacggaaaatcaat
ggttgttaatagcattaaagctaaaaatggtgatgatgtgtcacatcttttagaaatgcatcatgtattatctaaagatggcttagatgtcaa
acttcaagctatcttggctgaaagtggattatctccagttggtgaattctatatgtgggtagctaaggatccaacaagcttctataaagcttat
gtgcaaaaaggtttagatattacttacaacctctcattcaaagtacatcaaacatttactgaaagtgaaattgttaatggtgttgctcaaatt
gattttggcaatggctatcttggaaatcttgtagttaatgatttaccaaaaccagaagttcataaagacgtcatagatgaagcaggaaaatc
tattaacaacggtactgtaaaacttggtgatgaagtcacttacaagctagaaggttgggtcgttccaactggacgttcatacgatttattcga
gtacaaatttgtagatcagttacaaaatacacatgatctttatttgaaagatagtgttgttgccaaagttgatattactctatcagacggtac
agtcattacaaaaggttctgatttagcacaatatactgagacagtttacaacaaagaaactggacgctatgaattagcgttcaagaaagat
ttcttggctaaagttgtacgttctagtgaatttggagcagatgccttcttagttgttaagcgtattaaagcaggtgatgtc
tataacacaactgatctatatgttaatggtaacaaagtgaagtctgaaacagttgtgacacataccccctgaagcaccaaaaccagtcactcc
aactaaagaagtgccaaaaacacctgaaaaagtacttccacacacaggagaagaagggctttcaattttgaccgttattggtgcaagtatt
ctttcagtacttggtctttcagtacttaaaaaacctaaagaaaat

MNSNTKGHGFFRKSKAYGLVCGIALAGAFAFSGGNVSADEVTAPAERQTVVTTLTEPTNNQA
QAVTSEALNTAVSTAKEAGVTVNTTGAVSHTDVPSAQSDLASQTQTVKDATAKAEANTQAIKD
ATAQNAQIDAQNQAEATRVAEINKASQLAVDQKNAQGQALVDKQNADAQAQADATNAQLKA
DYEAKLAEIKTVEDYNKAVAERNALAKQQADATNAQLKADYQTKLDAYNKALADKINLIAND
VTFKGYGKSEDLNAYGIVTSDTITIDGAGNFILKEPMSDPTGVIGYITTKGKLNYSSVYDPTLN
KANITIDSITLNTWQLDLNRPSISGNTNAFAEYIGLDGTSLFKQAYTGLTSMSPITIGKTSQIGK
TFTVASGETTPEFMFLKTNPFWEFFAPSSLFAELTYNTAPLPNKPIEPTLVTVTPEALKPVPQT
PPTPVYVTPNLKSFTPEVYTPIKPTVKPHVAVPDKLVVTVSVHPVVVPVANPSKDVVDQAGKSI
NGLSVLPNSDLNYVALQDFSQYKGMSASQDKIAKNFIFIDDYKDEALDGKSMVVNSIKAKNG
DDVSHLLEMHHVLSKDGLDVKLQAILAESGLSPVGEFYMWVAKDPTSFYKAYVQKGLDITYN
LSFKVHQTFTESEIVNGVAQIDFGNGYLGNLVVNDLPKPEVHKDVIDEAGKSINNGTVKLGDE
VTYKLEGWVVPTGRSYDLFEYKFVDQLQNTHDLYLKDSVVAKVDITLSDGTVITKGSDLAQYT
ETVYNKETGRYELAFKKDFLAKVVRSSEFGADAFLVVKRIKAGDVYNTTDLYVNGNKVKSET
VVTHTPEAPKPVTPTKEVPKTPEKVLPHTGEEGLSILTVIGASILSVLGLSVLKKPKEN

SEQ ID 26

atgggagaaacaactctaggtctcgccaattcagctgatcagacgattgccttaaaatatgaagccaataatctgaacttggtttcaacagt
gcttcatgaaatgacgcatattatcgactttaagagtggcctctattcagaaacgactgaccgtaatacagatggtagtcttagtacggtcat
ggccttttcagatacccaagagttcttagatgtctaccatacctatttgaccgaccggatgtttggtcttactatcgtgataacagcgaagaa
gcttttgctgaagggctcagtcagtatatcatgcaccgtctctttggaacaccatactcgacatatattgccaatccttatactggagatgccta
caatccaggtgatggttcaggttatagcccatttgcggaaacagaattttatttgccagcttatacaaccgtttatttgaatacccgagaaca
gctcaagttgttccatatcttgtcactactacgacaacagctccagtaaatggtcaagttatttacggagcaatgccagaggaaacaactaca
acaacaccttacacaacagtttatgtgggagataccagtttcgcctatgaccctactggacagactgaccgtgtacaagcaggtgtcgatgg
gacagaaaccattcgcacgacctactcactagatagcaataaccagttggtagcaactcagacggttatttcatctactcctgttcaaaatca
aattattacaaaaggcactcaacctaccgttgttgacactagtgttccaatgactattgtttatcaagaagtcacagatggttcattgggtgac
tggcaagttaacgttttggatgcaggtcaagatggcttaatccgtagcacaacaacctatagtgttgatcctgtgacaggtattgtgacacca
agtacaacagaagctactatcacagcaatgagaccaatgattgttcaataccaagttggttccgaaaaagtgacagctattccttaccaaac
ccgttatgttatagatactagtttagcaactggaacacaagttattgtacaagaaggtgtcaacggtagctcaaccgagagtgttcagtctta
taactttatccaagatggctcaaatagtcgatttgacgctattgtctatgctagtccagttgttgtagctgcccaagaccag
gtgatagcagtaggaggtcaagaccaagtaactgaccaagctgtcgcaaaaacgattttctatcaagaagttactgatggttcattgggcg
actggcaggttaaagtcttagatgcaggtcaagatggtttggttcgtacaacgacaagctatagcgttgaccctgtgacaggtattgtgaca
ccaagtacaacagaagcaactatcaccgcgatgaaaccaatgattgttcaatatcaagttggtaaatctaaacttagtgccattccttttctg
acagagtatataactgatgatagcttagctgttggcttagaaaaagtcattcaagaaggcgtcggagggactcaaatcgagacagttcaat
cctttaattttattcaagatggtgcaaattctcattttgaaaacattgtctacagttccccaactattgttgttgctgctgttgatcaagtcatag
cgcgtggaacgaaagtagttgaagttgtagttgcagtaccagaagttgtaacaccgaaaccagaaacatcggaagtgataagtcctgaaa
aaggccaaacagctcctactattacagttgaagctattaaagccccggctcagaaaaaggctaaagttgaagttgttacaactccaaaaga
aagtttgccaacaactggtgatgatcaaaatctactcgtgactctcatgtcaagtctcttattaatgagtctaggtttaggacttaagaaaaa
agaagacgaa

MGETTLGLANSADQTIALKYEANNLNLVSTVLHEMTHIIDFKSGLYSETTDRNTDGSLSTVMA
FSDTQEFLDVYHTYFDRPDVWSYYRDNSEEAFAEGLSQYIMHRLFGTPYSTYIANPYTGDAYN
PGDGSGYSPFAETEFYFASLYNRLFEYPRTAQVVPYLVTTTTTAPVNGQVIYGAMPEETTTTTP
YTTVYVGDTSFAYDPTGQTDRVQAGVDGTETIRTTYSLDSNNQLVATQTVISSTPVQNQIITKG
TQPTVVDTSVPMTIVYQEVTDGSLGDWQVNVLDAGQDGLIRSTTTYSVDPVTGIVTPSTTEATI
TAMRPMIVQYQVGSEKVTAIPYQTRYVIDTSLATGTQVIVQEGVNGSSTESVQSYNFIQDGSNS
RFDAIVYASPVVVAAQDQVIAVGGQDQVTDQAVAKTIFYQEVTDGSLGDWQVKVLDAGQDGL
VRTTTSYSVDPVTGIVTPSTTEATITAMKPMIVQYQVGKSKLSAIPFLTEYITDDSLAVGLEKVI
QEGVGGTQIETVQSFNFIQDGANSHFENIVYSSPTIVVAAVDQVIARGTKVVEVVVAVPEVVTP
KPETSEVISPEKGQTAPTITVEAIKAPAQKKAKVEVVTTPKESLPTTGDDQNLLVTLMSSLLLM
SLGLGLKKKEDE

SEQ ID 27

atggtgaaaaataacattcactcgagaaaaaaacatatattaaaaatctcattattagcaacaagtgtattaacgacaac
agtttcaacagtctcagcagagcaattgcaaaatgaaaagcagtcggatttgcttagtaagatgacagaaacatctacgc
ctcatactatcataagttcagaagacctctcaaactcaaatcaagaggccaatcaaaaggatgagactgcctcaaaaagc
ttacaacctatgattgaaaaagtcgatccatctcatatccaggctctttgggaaaaagttggcacaggggaaggagatgt
cttagctgtcatagattcaggaattgaaaccaaacattccatgctacagcttccagaggatgctgacaaaatgtacacag
atcaagccagcattgacagtaagaaacaattattaggtattgaacgaggacagtggataaatgataagctcccatttac
catgattacacacaaggggaagagtctattgacagaaatacctaccatggaacccacgtcgcagggattgcaactgcttc
aggcctaacacagaaagaaaataaggagcaaatgcaaggcattgttcccaatgctcaattattatttttaaaagtagggc
aaccaagtgtagaaggtgaaagagaaaagcattatgccatggctattaaagatgctattgctttaggagcaacagctatt
aatatgagttttggacaagttggaaaagctagccatgaacttaatgatgatttcaaaaaagccttagcattagcagcaga
taaaggcgtcgctattgttgttgctgcaggaaatgattatgccatgggcggcagccagacgaaacctcttgcgaaaaatc
ctgatacaggtgtcattggaactccagcaactacggaggaggtttttacagtagcagcatatgttgcaccgcactattgg
agcagagtactatcggttactgacggtagcacatcaaaagccttggcgcttgaaatggctagtccatttgcagaaaataa
ggactatgagctcattttcttagaaaagggattagaaacggaagagaatgcagaaagactgaaaaataaggttttagtct
tgaattatgactttgttaccaattccaaagaagttgctgaaaaagttgaggctttgggagcagctggtgtacttgtccac
aataatcaagctaaaaaaccgctcattcctttagcttataatggtcctttacctatgggctttatcagtaaagaggatgc
agattggttaaaaacgatgacaagtccacagtttagattaaaaaaagagaagcaattagttgaggtgcctggtggcagac
aaatgacaaactttcaagctggggcttatcagttgatggcaatatgaaacctgattttgctgcacctggctatgaaatt
tattcacctactccaggaaacgactactcaaagatgtcaggaactagtgctgcaagtccacatgctatgggaattattca
tttagtccgtaaacacattcagaaagaataccctcacttaagtgctaaggaacagttacagttagttaagaacttattaa
tgtctactgccagtccaatttattcagagttagatcacagttactattctcctagggttcaaggagcaggggcactggat
gccaaaaaggcccttgaaacagatgtttatgtaacagctgcggatggtctttcaaaaattcaattaggtgatgtcaataa
tcagttcgaattaagagtaaccttacataatttaagcaatcaggaaaaaaactttacttactttgcaagggtgcttactg
acaaagttgaaaaggggcgtattctcttgcgtccacaagagctatatcaaacgagacccctccaagtaaaactagctccg
aatcaaaagcaagaagtggttatcaaggttgatatttctaactttgatcaacagcttaaagctcaaatgcctaacggtta
ttttctagatggttttgtagtatttcagtctaaggaaggtgctcaaaaagacttatctattccctttatcgctttcaaag
gaaaatttgcagatttagaggctcttgatagtccaatttatcgaaatttagatggtacgtttttactacagccccaaagaa
ggccaagacccttatgactttgaagtggatagtatccaacaaattaaagaacaatatatgactggtcttataacaacatt
tacgccttggtcactggttgaaggaagtaaaatagatggcttttcaccagagatggcttctgaatttagcacgactgatt
acctcggttcctataataaagaaggagataatacagttcgtcgattccgatttgtcgaaggcaaaccttatctagcactt
tcacctaatggcgatgataatatggataaagtgggatttagaggtgttttcttaagaaatgtcagagacatcaaagcaca
ggtatttgcaagtgatgatttgcaacatccgatttgggagagtcctataaaagcttttgctaaaaaagatgtgaatacaa
atgatatcaaagaaagcatgcttgaaaataccgtttgggaaggtaaagatgcttctggaaatccggttacagagggatta
tatcgatatcgtgtaacttatacgccacttgctgaaggggccaaagaacagtttattgattttgatattctagttgattt
aaccccgtcaaaactgccacaaagtgcaatcttgatgctagccgaaagacggattgagctaacagaatcaagagactatt
tatctcatgatacttatcgtgatcgactttactataaatatggaacagatgatattaatttcaccacttttgaaaaagat
gatatgggacattttgtgatcccaaaccaagttgaagatgaactcagtggagagaagattactatcaatcttgataaaac
tgatcatttcttctttgtcagagaagatttctcaggtaattttagtgttattagcctgtcacaattattgaacaatcatt
cagatcaaatgcattcacttgaagagagtaagagtgatagaaaagaatctaatacaggtgatattagacacgaaaagcaa
gaaaatcttagtcaacaaactctactatcgacaccatcaattgatggccaaaaacaaaatgaccaattaatggttgaaaa
agagaaagacattatggatgaaagtaagtctgaaagaagtgagaaaaataagtttccaaaagttcccgcttcaatcacgc
ttaaggatggaactctttatccgcagtcaataagccaaaaaacaagtcttcctaaaacagttgattcacaaaagacaatg
acatttttagggattgccatgttatttggtggcatattacaagtcctatggtcatactttaaaaagagagat

MVKNNIHSRKKHILKISLLATSVLTTTVSTVSAEQLQNEKQSDLLSKMTETSTPHTIISSEDLSN
SNQEANQKDETASKSLQPMIEKVDPSHIQALWEKVGTGEGDVLAVIDSGIETKHSMLQLPED
ADKMYTDQASIDSKKQLLGIERGQWINDKLPFYHDYTQGEESIDRNTYHGTHVAGIATASGLT
QKENKEQMQGIVPNAQLLFLKVGQPSVEGEREKHYAMAIKDAIALGATAINMSFGQVGKASH
ELNDDFKKALALAADKGVAIVVAAGNDYAMGGSQTKPLAKNPDTGVIGTPATTEEVFTVAAY
VAPHYWSRVLSVTDGSTSKALALEMASPFAENKDYELIFLEKGLETEENAERLKNKVLVLNY
DFVTNSKEVAEKVEALGAAGVLVHNNQAKKPLIPLAYNGPLPMGFISKEDADWLKTMTSPQF
RLKKEKQLVEVPGGRQMTNFSSWGLSVDGNMKPDFAAPGYEIYSPTPGNDYSKMSGTSAASP
HAMGIIHLVRKHIQKEYPHLSAKEQLQLVKNLLMSTASPIYSELDHSYYSPRVQGAGALDAKK
ALETDVYVTAADGLSKIQLGDVNNQFELRVTLHNLSNQEKNFTYFARVLTDKVEKGRILLRPQ
ELYQTRPLQVKLAPNQKQEVVIKVDISNFDQQLKAQMPNGYFLDGFVVFQSKEGAQKDLSIPF
IAFKGKFADLEALDSPIYRNLDGTFYYSPKEGQDPYDFEVDSIQQIKEQYMTGLITTFTPWSLV
EGSKIDGFSPEMASEFSTTDYLGSYNKEGDNTVRRFRFVEGKPYLALSPNGDDNMDKVGFRG
VFLRNVRDIKAQVFASDDLQHPIWESPIKAFAKKDVNTNDIKESMLENTVWEGKDASGNPVT
EGLYRYRVTYTPLAEGAKEQFIDFDILVDLTPSKLPQSAILMLAERRIELTESRDYLSHDTYRD
RLYYKYGTDDINFTTFEKDDMGHFVIPNQVEDELSGEKITINLDKTDHFFFVREDFSGNFSVIS
LSQLLNNHSDQMHSLEESKSDRKESNTGDIRHEKQENLSQQTLLSTPSIDGQKQNDQLMVEK
EKDIMDESKSERSEKNKFPKVPASITLKDGTLYPQSISQKTSLPKTVDSQKTMTFLGIAMLFGG
ILQVLWSYFKKRD

SEQ ID 28

atgcgatttttgaaaggtaaaaaagtttttctagctgttataggtttggcagtcatgatgacacttgtcataatgttccaaccacaagcaaaa
aataagagtgtatctgctgaaaccctagcttcagggcaaacacaagcatttatcaatcaaatcgcgggtactgcaagccaaatcgcagctg
aacgagatttatatgcgtcagtcatgattgcccaagcggttttagaatctagtagtggccaatcaggtttaagtcaggcgccatattataattt
ttttgggattaaaggaagttataatggtggctcagttacaatgaaaacttgggaagatgatggattgggaaatccttatgaaattgatcag
gctttccgtgcctatccaagtatttatgattccctttatgattatgctaatttgttaagttcaccaacttatgtcggagcaagacgatctaatacc
ttatcttaccaagatgcaacagctgctttaacgggattatatgcaacagatacttcctataatgttaaattgaatgccattatacaaaattatg
gcttgacagcatatgatgttgttaatcctgcagttgcaacttccacaacagatgtccctagtgatagtgttgcaactgttgatactagccaata
cgtttggaacaaacacagaggaagttacacagatactagcactttagcacaagacgatgcttggtctctttcataaaaggctat

MRFLKGKKVFLAVIGLAVMMTLVIMFQPQAKNKSVSAETLASGQTQAFINQIAGTASQIAAER
DLYASVMIAQAVLESSSGQSGLSQAPYYNFFGIKGSYNGGSVTMKTWEDDGLGNPYEIDQAFR
AYPSIYDSLYDYANLLSSPTYVGARRSNTLSYQDATAALTGLYATDTSYNVKLNAIIQNYGLTA
YDVVNPAVATSTTDVPSDSVATVDTSQYVWNKHRGSYTDTSTLAQDDAWSLFIKGY

SEQ ID 29

atgaaaaagatatttcaaagaaaatggttcaaacgaacatccattgttttaggtattttgcttgtagctctgattgccttaggttctttttatta
ttcaaagtcagccgtgattgatcgttatgttgttgctaaaagtaaaaagaatggcgggtcctttgaaaatattaaagctttttagtctgggat
gataccgatgaaatcattacaaatgatcaagcagcttttgcttcattcacgccacttccaaaatcagagatttcctcgttaaaaaaagagctc
aaaagtgcaacagcctctgatccagtatacattaagtccattggtcatcgtttttggatttttccggattatcgggtagccatgaaaccaatgt
cactaaccttaaaaacgaatgtccctaatatggatctgctcttaaatcagaaaaaagtagcaacatctaattcggaaaattttacgacagaa
ttaaaaaggttaccaattgctgactacagtgcaagtatcaatgggacttacaaagataaaaaaatcaaagttactaaaaaatatgatggg
caaaaaccagtactagatttatctgttacatttaagaattttacagtaagcagtaatcttacagaaggtgagctttattttgacgaggatcgc
gtcggtactctaaaaaatggtcagtatcaagtcacagactatcccattactaatggtagcaaagcttttgtaaaacgaaatttcccagatggt
gagctcaagagtgaaaaagctgaccttgaacaggttgctgaaggttctgaactgaagttaacggtcgataatctcttagatcgcactaaag
ctggagaatatcttttagctgcttttaatcaactgatggcatatacaagtagccgacaagattcaacgacagttgcagatgtcttcgaaaatg
gcgtaaataacgatttttataaaggtttaaaagaaagtgtgaaagcaaaattggaaacagatagtcgcaaggcttctagttttgccattcca
aatgttgccctaaatgccatgacgcaagtcggcaaggagtcttacctcttagattttgcggctacatatgattttgcctatccaaaagaaaca
gaccctgaaaaaggcagttcaggtaacatcattcaagagttaagtggacaactaacgctcaaaaaatcaggagatcgttatgtgattagtc
aagctggtacaaaaaatatctctgtgaccagtgaaaaaaatatattaaaaaaccgtcattactgccagatggcatagttggaacttggaa
gggaactaaagacgacattacctatacgttgaccatttctgaggatggaacagtaacacgtcatatcgatttcaaagatccgaaaaaagct
gatgaaagtagaacagcaaaaatcacgaagaccgaagaaaagaatccaggagatttccaggttattatcaccccagaaactgatagctc
aattctcatcattggtggtggtattggtggtgctaacatcaagtatgcctatggccttcatttagatggcaatcaattaacaccgattatttggc
aaacaggtatggataaggactttgatttttcgaaaccggcaccaggtttacctttaacgaaacaa

MKKIFQRKWFKRTSIVLGILLVALIALGSFYYSKSAVIDRYVVAKSKKNGGSFENIKAFLVWDD
TDEIITNDQAAFASFTPLPKSEISSLKKELKSATASDPVYIKSIGHRFWIFPDYRVAMKPMSLTL
KTNVPNMDLLLNQKKVATSNSENFTTELKRLPIADYSASINGTYKDKKIKVTKKYDGQKPVL
DLSVTFKNFTVSSNLTEGELYFDEDRVGTLKNGQYQVTDYPITNGSKAFVKRNFPDGELKSE
KADLEQVAEGSELKLTVDNLLDRTKAGEYLLAAFNQLMAYTSSRQDSTTVADVFENGVNNDF
YKGLKESVKAKLETDSRKASSFAIPNVALNAMTQVGKESYLLDFAATYDFAYPKETDPEKGSS
GNIIQELSGQLTLKKSGDRYVISQAGTKNISVTSEKNNIKKPSLLPDGIVGTWKGTKDDITYTLT
ISEDGTVTRHIDFKDPKKADESRTAKITKTEEKNPGDFQVIITPETDSSILIIGGGIGGANIKYAY
GLHLDGNQLTPIIWQTGMDKDFDFSKPAPGLPLTKQ

SEQ ID 33

atgaatacatcaaaaaaaattgttacgggatttgtaacgcttgcatctgtccttacccttgcagcatgttcttcaacaagtgacaatacaaaa
gtagttaccatgaaaggtgataccattacagtaactgatttttataatgaagctaaaacgtcaacagcggcacaacaatccatgttgagttt
gattttatcacgtgtctttgaaaaagaatatggtaaaagtgtccctgagaaaaaggttgaggaatcttataataaaacagctaagcagtac
ggttcttctttctccgatgctttagcacaggcaggactgacaacggacacctataaaaaacaaattcgcactacaatgttagttgaatatgcg
gtaaaacaagctgccaaaaaagaactaacagatgataattataaaaaagcttttgaatcatataccccctgaaatgacaacacaagttatt
gcttttgatgatgaagaaaaagccaaaaaagttttagaagaaacaaaagctgaaggtgctgactttgctaacatcgcaaaagaaaacac
gactgaagccaataaaaaaaattgattacacctttgattcagccgacactgttttaccaagtgatgtcattaaagaaacagcaaaattaaatg
aaggtgaaaaatcagctgttattacagttatggattcaagaacttatcagaaaaaatattatgtggttcatttagtcaagaaagctgagaa
aaaagccgattggaaagaatacaaatcacgactaaaagaaatcattatgaatgaaaaggaaaacgacagtaacttccaaaacaaagtg
atttcaaaaacttagataaggcaaatgttaaaattaaagacaaagcctttgcaaatatcttgtcacaatttgcttctaataaaaacaatac
caacaatgctttaacaagttcagtaggtaaa

MNTSKKIVTGFVTLASVLTLAACSSTSDNTKVVTMKGDTITVTDFYNEAKTSTAAQQSMLSLIL
SRVFEKEYGKSVPEKKVEESYNKTAKQYGSSFSDALAQAGLTTDTYKKQIRTTMLVEYAVKQ
AAKKELTDDNYKKAFESYTPEMTTQVIAFDDEEKAKKVLEETKAEGADFANIAKENTTEANK
KIDYTFDSADTVLPSDVIKETAKLNEGEKSAVITVMDSRTYQKKYYVVHLVKKAEKKADWKE
YKSRLKEIIMNEKENDSNFQNKVISKTLDKANVKIKDKAFANILSQFASNKNNTNNALTSSVG
K

SEQ ID34

atgaaatcatggcaaaaaattatcgttagcggagcaagtttaacacttgcaagtacacttttagtgggctgtgcttctgactcaaaaggaaa
aacagaatcagcatcatcagattcaaaaacaattaaattgtgggttccaactggggctaaaaaatcttatgcagatactgttgctaaatttg
agaaagattctggttataaagtaaaagttattgaatcagaagatccaaaagctcaagaaaaaatcaaaaaagatgctactactgctgctg
acgtattttcacttcctcacgaccaacttggtcaattagtagaatctggaactattcaagaagtaccagaacaatacactaaagatattgctg
caactgcgactgatcaagcaattgtaggtgctcaatataaaggcaaaacttatgctttcccatttggaattgaatcacaagttctttttctataa
taaagaaaaattaagcgctgaagatatcgcatcttatgatgcaattacaagcaaagcaacatttggtggtaccttcaaacaagctaatgctt
acgtaactggtcctttattcatgtctgttggtaacacattgtttggtgaaaacggtgaagatactaaaggaactaactggggtaacgaaaaa
ggtgctgcagtacttaaatggattgctgatcaaaagaacaacaaaggatttgttagcttagatgctaataacgttatgtctaaattcggtga
cggttctgtagcctcatttgaatcaggtccttgggattacgaagctgcacaaaaagctatcggtaaagacaaacttggtgttgctgtttatcca
aaagtgactatcggtggtgaagaagttcaacaaaaagcattccttggtgttaaattatacgctgttaaccaagcacctgctaaaggtgatac
taaacgtattgcagcaagctataaacttgcttcttacttaacgagtgctgaaagccaagaaaatcaatttaaaacacgtcatatcgtacctgc
taacaaagagattcaatcatcagaagaagttcagtcaaatgaacttgctaaaacagttattacaatgggatcttcaaaagattacacagtt
gtaatgcctaaattaagccaaatggcaacattctggactgaaagtgcagctattttaagtgatactttcaatggtaaaattcaagaa
gctgattacctaactaaattacaacaatttgataaagatatcgcttctacaaaa

MKSWQKIIVSGASLTLASTLLVGCASDSKGKTESASSDSKTIKLWVPTGAKKSYADTVAKFEK
DSGYKVKVIESEDPKAQEKIKKDATTAADVFSLPHDQLGQLVESGTIQEVPEQYTKDIAATAT
DQAIVGAQYKGKTYAFPFGIESQVLFYNKEKLSAEDIASYDAITSKATFGGTFKQANAYVTGPL
FMSVGNTLFGENGEDTKGTNWGNEKGAAVLKWIADQKNNKGFVSLDANNVMSKFGDGSVA
SFESGPWDYEAAQKAIGKDKLGVAVYPKVTIGGEEVQQKAFLGVKLYAVNQAPAKGDTKRIA
ASYKLASYLTSAESQENQFKTRHIVPANKEIQSSEEVQSNELAKTVITMGSSKDYTVVMPKLS
QMATFWTESAAILSDTFNGKIQEADYLTKLQQFDKDIASTK

SEQ ID37

atgaacaagaaatttattggtcttggtttagcttcagtagctatattaagtttagctgcatgtggcaaccgtggtgcttcaaaatctgatagca
aagatgctaaaacagatttaaaagctgctattgttactgatacaggtggtgttgatgataaatcatttaaccaatctgcttgggaaggtttag
aagcttggggtaaagaaaatgggcttaaaaaaggtgctggtttcgactacttccaatcaaatagtgaatcagaatatgctactaatcttgac
actgctgtctcaagtggttataacgtagtatatggaatcggatttgcccttaaagatgcaattgataaagctgctggtgacaatagtgatgtt
aactatattatcgttgacgatgtcatcgaaggaaaagataatgttgcaagtgtaacttttgcggataacgaagctgcttatcttgctggtatt
gctgcagctaaaactacaaaaactaaagtagtaggttttgtaggtggtatggaaggtactgttatcactcgttttgaaaaaggttttgaggc
gggagtgaaatcagttgatgattctatccaaatcaaagttgactacgctggatcatttggtgatgctgctaaaggtaaaacaattgccgcag
ctcaatatgcaggtggtgctgacgttatttatcaagccgctggtggtactggagcaggtgtcttcaatgaagctaaagctgtaaatgagaaa
aaagatgaagctgataaagtttgggtaatcggtgtagaccgtgaccaaaaagaggaaggtaaatacacttcaaaagacggtaaagaatc
taactttgttctagcatcttcaattaaacaagttggtaaatctgtacaactgattaacaaacttgttactgataaaaaattccctggtggaaa
aacaactgtttatggattaaaagatggtggtgttgatattgcaacaacaaaccttctgatgatgctataaaagctgttaaagaagctaaag
aaaaaattatttctggcgatgtaaaagttcctgaaaaataa

MNKKFIGLGLASVAILSLAACGNRGASKSDSKDAKTDLKAAIVTDTGGVDDKSFNQSAWEGL
EAWGKENGLKKGAGFDYFQSNSESEYATNLDTAVSSGYNVVYGIGFALKDAIDKAAGDNSDV
NYIIVDDVIEGKDNVASVTFADNEAAYLAGIAAAKTTKTKVVGFVGGMEGTVITRFEKGFEAG
VKSVDDSIQIKVDYAGSFGDAAKGKTIAAAQYAGGADVIYQAAGGTGAGVFNEAKAVNEKKD
EADKVWVIGVDRDQKEEGKYTSKDGKESNFVLASSIKQVGKSVQLINKLVTDKKFPGGKTTV
YGLKDGGVDIATTNLSDDAIKAVKEAKEKIISGDVKVPEK

SEQ ID 41

atgaaaaaattacttgtcacattagtgttgattttcagcacattatcattgattgcttgttcatcacaaagcacaaagcaagaagatcataaa
acaaaactatcacaaatgccaaagatctctggttttacctataaagggaaggtaccagaaaaccctaaaagagtagttagtttatcttcaac
ctacaccggttatttggcaaagctcgatatcccactagttggaatcacttcttatgatcacaaaaatcccgtcttaaagaaatacatcaagga
tgctaaagttgtctctgcaaccgacctagaaagcattacggccttggaacctgatttaattattgtgggttcaaatgaagaaaatatcagtca
attagctgaaatcgctccccttatttccattgaatacccgcaaacatgactatttacaggtattctcagattttggtaaagtctttaacaaaacca
aagaaaccgacaaatggttacaggaatggaaaacaaaaacagcttcttttgaaagtgacgttaaagcagttacaggtaataatgctacct
ttaccataatgggattatatgagaaagatatctatctttcggtaaagattggggtcgtggtggtgaaatcattcaccaagccttccaatatc
aagctccagaaaaagtaaaaatggaggttttcccaaaaggctatttgtccatttcacaagaagttcttccagattatattggtgattatgtcg
ttgtcgctgcagaggatgaaaaaacaggttcttctctttatgaaagtgacctttggaaaaatataccagccgttcaaaaaaatcatgtcata
aatgttaatgcgaatacctttatttcactgaccctctgtcattagagtatgaattaaaaaccttaacggatgctatcttgactcagaaaactc
acaac

MKKLLVTLVLIFSTLSLIACSSQSTKQEDHKTKLSQMPKISGFTYKGKVPENPKRVVSLSSTYT
GYLAKLDIPLVGITSYDHKNPVLKKYIKDAKVVSATDLESITALEPDLIIVGSNEENISQLAEIAP
LISIEYRKHDYLQVFSDFGKVFNKTKETDKWLQEWKTKTASFESDVKAVTGNNATFTIMGLY
EKDIYLFGKDWGRGGEIIHQAFQYQAPEKVKMEVFPKGYLSISQEVLPDYIGDYVVVAAEDEK
TGSSLYESDLWKNIPAVQKNHVINVNANTFYFTDPLSLEYELKTLTDAILTQKTHN

SEQ ID 48

atgaacaagaaatttattggtcttggtttagcttcagtagctatattaagtttagctgcatgtggcaaccgtggtgcttcaaaatctgatagca
aagatgctaaaacagatttaaaagctgctattgttactgatacaggtggtgttgatgataaatcatttaaccaatctgcttgggaaggtttac
aagcttgggtaaagaaaatgggcttaaaaaaggtgctggtttcgactacttccaatcaaatagtgaatcagaatatgctactaatcttgac
actgctgtctcaagtggttataacgtagtatatggaatcggatttgcccttaaagatgcaattgataaagctgctggtgacaatagtgatgtt
aactatgttatcgttgacgatgtcatcgaaggaaaagacaatgttgcaagtgtaacttttgcggataacgaagctgcttatcttgctggtatt
gctgcagctaaaactacaaaaactaaagtagtaggttttgtaggtggtatggaaggtactgttatcactcgttttgaaaaaggttttgaggc
gggagtgaaatcagttgatgattctatccaaatcaaagttgactacgctggatcatttggtgatgctgctaaaggtaaaacaattgccgcag
ctcaatatgcaggtggtgctgacgttatttatcaagccgctggtggtactggagcaggtgtcttcaatgaagctaaagctgtaaatgagaaa
aaagatgaagctgataaagtttgggtaatcggtgtagaccgtgaccaaaaagaggaaggtaaatacacttcaaaagacggtaaagaatc
taactttgttctagcatcttcaattaaacaagttggtaaatctgtacaactgattaacaaacttgttactgataaaaaattccctgtggaaa
aacaactgtttatggattaaaagatggtggtgttgatattgcaacacaacaaaccttctgatgatgctataaaagctgttaaagaagctaaag
aaaaaattatttctggcgatgtaaaagttcctgaaaaataa

MNKKFIGLGLASVAILSLAACGNRGASKSDSKDAKTDLKAAIVTDTGGVDDKSFNQSAWEGL
QAWGKENGLKKGAGFDYFQSNSESEYATNLDTAVSSGYNVVYGIGFALKDAIDKAAGDNSDV
NYVIVDDVIEGKDNVASVTFADNEAAYLAGIAAAKTTKTKVVGFVGGMEGTVITRFEKGFEAG
VKSVDDSIQIKVDYAGSFGDAAKGKTIAAAQYAGGADVIYQAAGGTGAGVFNEAKAVNEKKD
EADKVWVIGVDRDQKEEGKYTSKDGKESNFVLASSIKQVGKSVQLINKLVTDKKFPGGKTTV
YGLKDGGVDIATTNLSDDAIKAVKEAKEKIISGDVKVPEK.

SEQ ID 49

atgaataaaaaattaacatcccttgccttattatcagctgctattatcccattagcggcatgttctcataaaggccaaaaatctgcttctttatc
agatttaaaagtagccatgattactgaccaaggggtgttgatgataaatcctttaaccaatcagcttgggaaggtctacaagcttggggca
aatcaaaaaatttgaaaaaaggaagtgattttaattatttccaatcaaccaatgaatcagaatatgtgacaaaccttgatactgcaaagtc
aaatggttttaatgtcatctttggtattggctttaacctgactgattctattaaaaaagcgtcttctgataacgcagatacaaaatacgctatt
gtcgatgatgtcattgaaggaaaagacaatgttgcaagtatcacttttgccgacaacgaagcagcttacttagctggtgttgcggctgctaa
aaccagcaaaagcaaacaagttggttttgtaggtggtatggaaggaaccgttgttaaacgttttgaaaaaggctttgaagcaggtgttaaa
tcagttgatccttctatcaaagtatcaatcgcttacgcagggtcatttgcggatgctgctaaaggaaaatcaattgcagcaacacaatatgca
agtggtgctgatgtcatctatcaagcagcaggtggaacgggtgctggtgtcttcaacgaagccaaagctattaatgaaaaacgtgccgcttc
agataaagtttgggtccttggtgtagaccgtgaccaaaaagctgaaggtgaatacactgataaagatggtcaaaaaggaaactttgtcctt
gcttcaagtatcaaagaagttggtaaaaccatgcaaaaagtcattggtatgactgaaaaaggtgacttccctggtggtaaagtcaatacctt
tggtttaaaagaatcaggtgttaacctcaccacaaaagatcttccagaagatgttaaaaaagcagttgaaacagcacgccaagacattatc
tcaggtaaaatcaaagtcccagaaaaa

MNKKLTSLALLSAAIIPLAACSHKGQKSASLSDLKVAMITDQGGVDDKSFNQSAWEGLQAWG
KSKNLKKGSDFNYFQSTNESEYVTNLDTAKSNGFNVIFGIGFNLTDSIKKASSDNADTKYAIV
DDVIEGKDNVASITFADNEAAYLAGVAAAKTSKSKQVGFVGGMEGTVVKRFEKGFEAGVKSV
DPSIKVSIAYAGSFADAAKGKSIAATQYASGADVIYQAAGGTGAGVFNEAKAINEKRAASDKV
WVLGVDRDQKAEGEYTDKDGQKGNFVLASSIKEVGKTMQKVIGMTEKGDFPGGKVNTFGLK
ESGVNLTTKDLPEDVKKAVETARQDIISGKIKVPEK

SEQ ID 50

atgacagtagcacaaaaatctacatttaagcgcttcggcctaggagctgtaacacttgcttcagcagccctattgatggcttgtggtaacaag
acagcagcaaaaaatgataacaaaaatgagattaactggtacacaccaacagaactcatcactttagacatttcaaaaaatactgacactt
attctggtcttgcaatcggtaactcagaaagtaacttacttcgtgttgacggaaaagggaaattgcaaccagacttagctaaaaaagtaga
agtttcagaagatggtttaacttatactgcaaccttgagagatggtttgaaatggtctgacggaagtgaattaacagcagaggactttgttt
acacttggaaacgtattgtagacccagcaactgcttcagaatatgcttacttagcaactgaatcacatttattaaatgctgaagatattaata
caggtaaaaacactgatttaaattctcttggtgttaaagccgaaggcaacaaagttatctttacattgagtgcacctgctcctcaattcaaga
gcttattgtcatttgctaacttcatgcctcaaaaagaagaatttgttactaaaacaggaaaagactatggtacttcttctgaaaaacaaattt
attctggtccatacattgtaaaagattggaatggtacaagtggttcattcaaattagttaagaatgacaaatattgggatgctaaaaacgtt
aaaatgaaaactattaacgttcaaacagttaaaaaaccagatacagccgttcaaatgtataaacaaggaaaacttgattatgcaaacatt
tcaggaacatctgctatatacaatgcaaacaaaaacaacaaagacgttgttcccgtattagaagcaacaactgcttatatggtatacaatca
aacaggttctgtaccagcattgagcaaccttaagattcgtcaagcattgaatttagcaacagaccgtaaaggaattgtgtctgcagcagtgg
atactggttctaaaccagcaacagcaattgctcctactggacttgcaaaacttaaagatggatctgatttaactaaatttgtagctcctggtta
taaatatgatgaaaaagaagcaggaaaacttttcaaagaaggacttgctgaactcggaaaagattctcttaaaattacaattaccgctgat
gcg
gatgcaccagcagctaaatcttcagttgactacattaaagaaacttgggaaaaagctttaccaggattaacagttgaagaaaaatttgttcc
atttaaacaacgtttagaagatacaaaaaatcaaaactttgaagttgctgtagcactttggggtggtgactatccagaaggatcaactttct
atggtttgtttaaatcaggttctgcatataactacggtaaattcaccaatgcaaaatttgatgctgcttatgaaaaagctttaacaaccgatg
cattagatacagacgccgcagctaatgattataaagaagcagaaaaagctctttatgatgaagcaaactataacccacttttacttccgtagc
ggagaaggattacaaaatccaagtattaaagggttaattcgtaattcaacaggtcttaatgttgactttacctatgcttataaaaaa

MTVAQKSTFKRFGLGAVTLASAALLMACGNKTAAKNDNKNEINWYTPTELITLDISKNTDTY
SGLAIGNSESNLLRVDGKGKLQPDLAKKVEVSEDGLTYTATLRDGLKWSDGSELTAEDFVYT
WKRIVDPATASEYAYLATESHLLNAEDINTGKNTDLNSLGVKAEGNKVIFTLSAPAPQFKSLL
SFANFMPQKEEFVTKTGKDYGTSSEKQIYSGPYIVKDWNGTSGSFKLVKNDKYWDAKNVKM
KTINVQTVKKPDTAVQMYKQGKLDYANISGTSAIYNANKNNKDVVPVLEATTAYMVYNQTGS
VPALSNLKIRQALNLATDRKGIVSAAVDTGSKPATAIAPTGLAKLKDGSDLTKFVAPGYKYDE
KEAGKLFKEGLAELGKDSLKITITADADAPAAKSSVDYIKETWEKALPGLTVEEKFVPFKQRL
EDTKNQNFEVAVALWGGDYPEGSTFYGLFKSGSAYNYGKFTNAKFDAAYEKALTTDALDTD
AAANDYKEAEKALYDEANYNPLYFRSGEGLQNPSIKGLIRNSTGLNVDFTYAYKK

SEQ ID 54

atgaaaaaatggtttttaatattaatgctttgggaatatttggttgtgctactcaaccatcaaaggttgcagcaataaccggttatgattccg
actactacgctagatatattgatcccgatgaaaataaaataacatttgccataaatgttgatggttttgtcgaaggtagtaatcaagaaatc
cttattagaggaattcatcatgttttaacagatcaaaaccaaaagattgttacaaaggccgagttgttagacgctattagacatcaaatggt
tcttctacaattggattattcctatgaactagtcgactttgcgcctgatgcacaattattaacacaagatcgacggcttttatttgccaatcaaa
attttgaggaatccgtatcacttgaagatactattcaagaatacctttttaaaagggcatgttattctcagaaaacgggttgaagaacctatca
ctcatcctactgagactgctaatattgagtataaagttcaattcgcgactaaagatggggaattccacccactacctatttttgtagactacgg
agaaaaacatattggagaaaaattaacctctgacgagtttcgaaaaattgcagaagaaaagctttgcaactctaccctgactatatgatt
gatcaaaaagaatatactatcattaaacacaattctcttggtcaacttccaagatattattcttatcaagatcatttcagctacgaaattcaag
ataggcaacgtatcatggctaaggacccaaaatccggaaaagaactcggtgaaactcaaagtattgataatgtttttgagaaatacccttat
taccaaaaaaagttataaacct

MKKWFLILMLLGIFGCATQPSKVAAITGYDSDYYARYIDPDENKITFAINVDGFVEGSNQEILI
RGIHHVLTDQNQKIVTKAELLDAIRHQMVLLQLDYSYELVDFAPDAQLLTQDRRLLFANQNF
EESVSLEDTIQEYLLKGHVILRKRVEEPITHPTETANIEYKVQFATKDGEFHPLPIFVDYGEKH
IGEKLTSDEFRKIAEEKLLQLYPDYMIDQKEYTIIKHNSLGQLPRYYSYQDHFSYEIQDRQRIM
AKDPKSGKELGETQSIDNVFEKYLITKKSYKP

SEQ ID 63

atggaattcgaaaacacaaaatctaatcagattaaaacaacacttgctttaacgtcaacactcgcacttcttggaactggtgttggtatggg
acataccgttaatgcggatgacatgacaactgctgatcaatcacctaaattacaaggtgaagaagcaacattggcgcctacaaacattgaa
gatactaaagcagccattgatattaaaacagctacattagcagaacaaaccgatgctcttaatactgtaaatgagacaatcacaagcacaa
atgaagaattagctactttagaaggaggcttagctgataaagaaacagcagttgcagatgctgaaaaaacattggagtctgtttcaaatgc
ctcagaagaagaatttaatcaattagcagaacaaaataaagctgacttagctaaaactcaagaggagctaaaacttgctgaagcaacaa
aagaagaagttgcaacacaggtattgacacaatctgacgaggtaacagctgcagctaatgaagctaaaaaaatggctgaaaaagttgca
caagcagagacaaaagtttcagacttgacgaaaatggtcaatcaaccagaagcaataacagctcaagttgaaatagaacaaaacaatgt
caaaatcatttcggaagatttagcaaaagccaaaactgatttagttgctgtaacagataatacaaaaacacaattagcaaatgatttagcg
actgctcaatctagcttaagtgccaaacaaaatgaattagctaaagtacagtcacaaacaagtaatgtcgcagtgaatgttatgggtgcta
ataaaatggttgctccaactaattacccaattaatgaaatcaaaaaattaatgtcaagtggttacattgggacacaatcttatctaaataca
ttctatgctttaaaagatcaactggtttctaaagcagaagttgggcatacttaaatcattacgttgatatcgcaagtgacttaaaccgtatcg
ttaacccagataacttatcagttgaggttcaaaatgaattggctgtatttgcagcaacattgattaattctgttcgtcaacaatttggtctttct
gcagtcgaagtgacgcaaggtgctcaagagtttgctcgcactttgactcgaaactataaagtaacacatggaaacactgttccttttctttaat
tacaatcaacct
ggcaagaatggtcatataggcattggtccacacgatagaacaattatcgaacaagcagctacaagtgttggcttaaaagctaatgatgata
atatgtatgaaaacatcggattctttgatgatgttcatactgttaatggtatcaaacgtagtatttataacagtattaagtacatgctgtttac
agacttcacctatggaaatacatttggacatacgttaacttgttgcgttctgataaaacaaacccaagtgctccggtctatttaggagtttca
acagaaactgttggtggtttaaatacccactatgttatcttcccggcaagcaatattgtaaatgccagccaattcagcaaacaagtggtttca
ggtccattaacaacagttgataacagtgctaaaattagcactcttcaagcaagtattacttctgttgagtctaaaattcaaaccttacaaaaa
cgtattgcaaatatttcttcagaagcactagttgtctctgcacagagaaaagtagatggtttagctgcaaaacttcaaaaagctgaatctaa
cgttgaaaaagcaaaagctcaacttcaacagttacaagattcaaaagaagatttacataaacaacttgctttttcccttcaactcgtaagg
atttaaaaggtcaacttgacgaatcgcttgttcacctaaatcagtctaaaattcttttacatagcttagaagaaaaacaaagtcaagtggca
agtcaaattaacgtcttgacattgaagaaggcacaacttgaaaaagaactagcctttaactctcatccaaatcgtgaaaaagttgcaaaag
aaaaagttgaagaggctcaaaaagcattaacagaaaccttatctcaaattaaaactaaaaaagctatcttaaatgatttaacacaagaaa
aagcaaaattgacgtcagcaatcacaacaactgaacaacaaattgttttgttgaagaatcatttagcaaatcaagtggcgaatgctccaaa
aatcagcagtattgtccaaagatcagaaaacaatagagtaagacctgatgtttctgatacaagagagaaggcagtagatactgctcaaga
agcgacaattcttgctcaagcagaaacaatggctgaagaagtcattacaaattctgcaaaagccattgttgcaaatgctcaaaatgttgcac
aagag
attatgaaagtagcacctgaagtaacacctgatcaaggagttgttgcaaaagttgcagataatattaagaaaaataatgccccagcaagt
aaatcatatggtgcaagttcatcaacggtaggaaatgctacttcttcacgagatgaaagtacaaaacgtgctttaagagcaggaattgttat
gctggcagcagcaggacttactggttacaaactcagaagagatggcaaaaaataa

MEFENTKSNQIKTTLALTSTLALLGTGVGMGHTVNADDMTTADQSPKLQGEEATLAPTNIED
TKAAIDIKTATLAEQTDALNTVNETITSTNEELATLEGGLADKETAVADAEKTLESVSNASEEE
FNQLAEQNKADLAKTQEELKLAEATKEEVATQVLTQSDEVTAAANEAKKMAEKVAQAETKV
SDLTKMVNQPEAITAQVEIEQNNVKIISEDLAKAKTDLVAVTDNTKTQLANDLATAQSSLSAK
QNELAKVQSQTSNVAVNVMGANKMVAPTNYPINEIKKLMSSGYIGTQSYLNTFYALKDQLVS
KAEVGAYLNHYVDIASDLNRIVNPDNLSVEVQNELAVFAATLINSVRQQFGLSAVEVTQGAQE
FARTLTRNYKVTHGNTVPFFNYNQPGKNGHIGIGPHDRTIIEQAATSVGLKANDDNMYENIGF
FDDVHTVNGIKRSIYNSIKYMLFTDFTYGNTFGHTVNLLRSDKTNPSAPVYLGVSTETVGGLN
THYVIFPASNIVNASQFSKQVVSGPLTTVDNSAKISTLQASITSVESKIQTLQKRIANISSEALVV
SAQRKVDGLAAKLQKAESNVEKAKAQLQQLQDSKEDLHKQLAFSLSTRKDLKGQLDESLVH
LNQSKILLHSLEEKQSQVASQINVLTLKKAQLEKELAFNSHPNREKVAKEKVEEAQKALTETL
SQIKTKKAILNDLTQEKAKLTSAITTTEQQIVLLKNHLANQVANAPKISSIVQRSENNRVRPDV
SDTREKAVDTAQEATILAQAETMAEEVITNSAKAIVANAQNVAQEIMKVAPEVTPDQGVVAKV
ADNIKKNNAPASKSYGASSSTVGNATSSRDESTKRALRAGIVMLAAAGLTGYKLRRRDGKK

SEQ ID 64

atgaaaaaattattagcttgtatgttaatggtctttttctatctcctatttctgttattagtactgaaaaatctatatcatttccaagtacaacc
attcatcaattgtctcaaaacgtgctaacttctagtacgtattttaatgcaattcctaaaaatccaaatgtctacgatgagcttcaaacatata
gtgatcaatctttaacaattccaagtggagttcttaaaccaaatgatgattttataatcaataatctttgttaaatcaaaataatttaccaat
ttttcaattagcaaatggacaatttatttttggcaaataaaaagttcatttatgaagacgaaacaactaatcaaaccaatctcaatagttggtt
gtggctacaaaaagattttacaatctatgaagaacctcttgtaaaaggagttttacctattaatagtgatttaaaaccttattcaaaagttca
tgttacaaaactatcacaaacacagcatggaaatttttattatattgaaaacaaaggttgggtttctgagaaatatctctcaaaagctgata
acagaatggtaaaagttcaagaaatgctgagtcaaaaatataataaagaaaattattctatttttgttaaacaattaacaacacagacaa
gtgcaggaatcaatgccgataaattaatgtattctgcaagtattgctaaattagcaaccttatactatgttcaaaataagattgaaactggta
aaacttctcttaatcagaccttaaaatatactgatcaagtaaaccattttaaaggtgactatgatccatcagggagtggtaaacttccaaaa
acgtcagataatgagaattatactgttgatgatttattaaaagcagttgcccagcattctgataatgttgctacaaatatacttggctattatc
tagctaatcaatatgatagagatttctctactcaaatgacagctatttctggtattaattgggatatggaagaacggatgttatcttcaaaag
cagcagcaaatgtaatggaatctatttactatcaaaatggacctattgtttcttatttaacaaatactgattttgacaatcaacgtatttctaa
aaatattgctgtaccagtagctcataaaattggtgatgcctatgattataaacatgatgttgcaatagtttatagtgactcg
ccattcattctatcgatttttagtgagaacgcatcctatgatgatattactgcaatcgccgatggtatttattctatattgaaa

MKKLLACMLMVFFLSPISVISTEKSISFPSTTIHQLSQNVLTSSTYFNAIPKNPNVYDELQTYSD
QSLTIPSGVLKPNDDFIINNLLLNQNNLPIFQLANGQFILANKKFIYEDETTNQTNLNSWLWL
QKDFTIYEEPLVKGVLPINSDLKPYSKVHVTKLSQTQHGNFYYIENKGWVSEKYLSKADNRM
VKVQEMLSQKYNKENYSIFVKQLTTQTSAGINADKLMYSASIAKLATLYYVQNKIETGKTSLN
QTLKYTDQVNHFKGDYDPSGSGKLPKTSDNENYTVDDLLKAVAQHSDNVATNILGYYLANQY
DRDFSTQMTAISGINWDMEERMLSSKAAANVMESIYYQNGPIVSYLTNTDFDNQRISKNIAVP
VAHKIGDAYDYKHDVAIVYSDSPFILSIFSENASYDDITAIADGIYSILK

SEQ ID 68

atgattagaaaagaaaattttaaaaaacgttatattagctttggaattttgggatttgcagtggcattgttagctcttgtttttgctttttcaag
taagaaagtagatacagaatcatatgctaaaaaatcagaatctaaagttgttaaaaatgtaacaaaatcacaatcaacatcatcttcaact
caaaaagttgaagcatcaacagaacaaagttcttcaagtcaagaacaagctacacctgatacttcagtggctactcaatcagtacctgtag
aacaggttgctcaaccaacaccgacaccttcaactgaggttgcacaacaggttgtaccagctcagcctagtgttccaacaactcaatatgctg
caactccagtaacttattatcaatcaaatggaaatactgccggagctattggtagtcaggctgctgctcaaatggctgcagcaacaggtgttc
ctcaatcaacttgggaagctattattgctcgcgaatcaaacggtaacccatatgtaagtaatgcatctggtgcctctggtttgtttcaaacaat
gccaggatggggttcaactgcaactgtacaagatcaaatcaattctgctatttcagcatataatgcacaaggcttatcagcttgggcttatta
a

MIRKENFKKRYISFGILGFAVALLALVFAFSSKKVDTESYAKKSESKVVKNVTKSQSTSSSTQK
VEASTEQSSSSQEQATPDTSVATQSVPVEQVAQPTPTPSTEVAQQVVPAQPSVPTTQYAATPVT
YYQSNGNTAGAIGSQAAAQMAAATGVPQSTWEAIIARESNGNPYVSNASGASGLFQTMPGWG
STATVQDQINSAISAYNAQGLSAWGY

SEQ ID 70

atgaaatcatttttaatagtcggatttggcttggacttgtttcggtgtttttgctattgtcctcttttaacagcagcttcaaatagttatcgaa
actctgcaaaccaagcatacagcccaatcgaaacctatacccacaacctatcagatgttcctatcgatatcaaatatgacagcgacaagtac
tttatcagtgagtactcctacgggcacaagtctatttgacctcaaccaaccgggttaaactggattccgaggttaacactgataccgtaatt
ttaaaatcgtcgcagacttaacagatagcaagcctggaaaagcaactgttcctcttaaagtcaataacctaccttctggcgtggcagccaaa
gtgaccccagataaaatgaccatcaccatcggcaagaaagcacgtaagacctttaatgtcgtaggaagtgtcgatccaaaacaagtggca
acaggttatgaattgctctcaatggacacaggcattgacaaagttgaagtgaccagtgacgagtctaagattgatttgattgatcatgtcgtt
gccaaactacctgacgatgttaaattaaatgcagactaccgaggagaagtgactcttcaagcagtctcagcagatggaacggttttagcca
gctccatttcaccagccaaaacgaccttatcggtttcagtcaaaaaaatcaccaagtctgttccaataagagtttcaatggtaggaaccatgg
atgaaagcttggcggatattcagccaaaacttggaaaagaaacagctgtcatttcagggccaagagaagttctggataccattaatgaagt
ggtagcggaagtcaatattagtggtgtgactaaagatacggaaaaaacggttagcctccattcggatattgtatccattgaaccttcttccgt
gccggttcagttgacaaccaaaaagaaa

MKSFFNSRIWLGLVSVFFAIVLFLTAASNSYRNSANQAYSPIETYTHNLSDVPIDIKYDSDKYFI
SEYSYGAQVYLTSTNRVKLDSEVNTDTRNFKIVADLTDSKPGKATVPLKVNNLPSGVAAKVTP
DKMTITIGKKARKTFNVVGSVDPKQVATGYELLSMDTGIDKVEVTSDESKIDLIDHVVAKLPD
DVKLNADYRGEVTLQAVSADGTVLASSISPAKTTLSVSVKKITKSVPIRVSMVGTMDESLADIQ
PKLGKETAVISGPREVLDTINEVVAEVNISGVTKDTEKTVSLHSDIVSIEPSSVPVQLTTKKK

SEQ ID 75

atgaagccatcaaatacggaaaaactatttctcattttgagtcttttaacattaattcttgcaggtagtttttatttattctttgcaagaaacca
tatcggaaacgccttaacacaaaaagaaacacaaacagttcaaaaaagtaatatgttaagcaaggccattgacgccctagaaaaagctg
agaaaaatccaagtcttgaagcaattgaaaaagctgagaaagccattaatcagttgaaaaaaactgatactaagttacgtctccaagagc
gactaaatcaactaaaaaaagctttctccattgaaaaggaagccattaaagcacttgaggaggctgaaaaaaatcctagtcttgaaacca
aagacaaagctaaagaagccattgataaaattggaaatctcaccaaaaaaaaatgagctcttaaatcgattaggagcaattgtcatttcag
atcaagcacctgaatcaagctccacatcgtcagaagctgcaagtgacacgactataagtgatgcaaacacaggaaatgcagaacaagcaa
ccatttatgaaagtccggttgcaccagctgaaagctatgttcctcaagccccgctcaaagtgttggagaacctgtccaacccgcaacaccaa
gtactcctgcgccaagccctgaggctccaagtactcctccaactgttcctgcgacagataccccaagtgaatcaacccctaatcca

MKPSNTEKLFLILSLLTLILAGSFYLFFARNHIGNALTQKETQTVQKSNMLSKAIDALEKAEKN
PSLEAIEKAEKAINQLKKTDTKLRLQERLNQLKKAFSIEKEAIKALEEAEKNPSLETKDKAKE
AIDKIGNLTKKNELLNRLGAIVISDQAPESSSTSSEAASDTTISDANTGNAEQATIYESPVAPAE
SYVPQAPAQSVGEPVQPATPSTPAPSPEAPSTPPTVPATDTPSESTPNP

SEQ ID 81

atgaagaaaaaaacacttgtcatgatgggattggcaggactagtagcaggcggtcaactctatcaagccaaagcagttttagcagaccaa
gaaaaactcaaagtggtaaccacttttatcctgtttatgaatttacaaaaggtgtggtaggtaaagagggagatgtttccatgctgatgaa
ggctggaactgagccacatgactttgaaccctcaacaaaagacattaaaaaaatacaagattcgcaagcctttatttatatggatgacaac
atggaaacttggattccagaagtgaaaaaagctattaagtcgaaaaaagtagcctatattgaaggtactggcgacatgttattagcagctg
gaacggaagaaggtcacgatcatgaaggagaagatgatcatcatcatgatggtgaagacaaacatggtcatgaagaacatagtcataaa
tttgatccacatgtttggttatctccatatcgcagtatttctgtcgttgaacatatacgtgattcactttctaaaaaatatccagaaaaagcaga
aaagtttaatgccaacgctcaagcctatattgaaaaattgaaaaagcttgattcggaatatacagaaactttatcatctgctaaacagaag
agttttgtgacgcaacacgcggcatttggatatatggcattggattatggcttgaatcaggttgctattaatggtatctcagcagagagtgaa
ccatcagctaagcgtattgctgaattgtctaaatatgttaaaaaatatgatattaactatatctatttgaagaaaatgcttcaaataaagta
gctaagactcttgcaaatgaagcaggtgtcaaagctgttgttttaagccctcttgaaggtttgacccaaaaagaaatggataagggagaag
attacttctctgtcatgcgtgataatttaaaagcccttcagttgacaaccgaacgcgaaggtaaggaaattgacccagaagaagatgcaagt
aaatctgtttataatggttatttcaaagattctgaagtcaaagaccgtaaattaagcgattggtctggtgattggcagtccgtatatccatact
tacaagatggtacccttgatcaggttatggattacaaagctaaaaagtctaaaggtgaaaaatctgcgaaagaattcaaagactattacg
aaacaggt
tataaaacagatgtcaacaagattcaaattgatggcaaaaagaaaaccatcacctttgaaagaaatggggacaagaaaacctttacttat
cagtactcaggcaagaaaatcttaacatatgaaaaaggaaaccgtggtgtccgttatatgtttgaaactaaggataaagatgcgggcgaa
ttcaaatacattcaatttagtgatcatggcattgctcccgaaaaagcaggacatttccacatttattggggtgatcaaggacatgatgccatt
gcttcaaaatgggatcattggccaacttactatggttctgatttaagtggtcgtgaaattgcccaagaaatgaatgctcat

MKKKTLVMMGLAGLVAGGQLYQAKAVLADQEKLKVVTTFYPVYEFTKGVVGKEGDVSMLM
KAGTEPHDFEPSTKDIKKIQDSQAFIYMDDNMETWIPEVKKAIKSKKVAYIEGTGDMLLAAGT
EEGHDHEGEDDHHHDGEDKHGHEEHSHKFDPHVWLSPYRSISVVEHIRDSLSKKYPEKAEK
FNANAQAYIEKLKKLDSEYTETLSSAKQKSFVTQHAAFGYMALDYGLNQVAINGISAESEPSA
KRIAELSKYVKKYDINYIYFEENASNKVAKTLANEAGVKAVVLSPLEGLTQKEMDKGEDYFSV
MRDNLKALQLTTEREGKEIDPEEDASKSVYNGYFKDSEVKDRKLSDWSGDWQSVYPYLQDG
TLDQVMDYKAKKSKGEKSAKEFKDYYETGYKTDVNKIQIDGKKKTITFERNGDKKTFTYQYS
GKKILTYEKGNRGVRYMFETKDKDAGEFKYIQFSDHGIAPEKAGHFHIYWGDQGHDAIASKW
DHWPTYYGSDLSGREIAQEMNAH

SEQ ID 92

atggcaaactacaaaaaaataacatctttatcacttttgacccttttatcacttgctacctttcagcaactcaatattctaaagtctatgcaca
agatcctgagtcatcctcatcagtcaatattaaaaccattgatggtcagttagctattgctgacaaagaggcagagccattatacaaagaaa
tggatagtattcaaatgagtatagaaaaaattaaggcaagccgctttaaacctgctgaaatagctattacaacagaaattcaacaactgga
aaatcttaatgaaactctattagaaaagttttatcagaaaattggcaatcgtatctggaatactaaagaagaagcactcaatttaattagta
agacaactctttcaccttctgaaaaagagctattaaaggactactttaataaagatgaggtattgcaaaaaaaattaaaagaaaatgactt
actcattgatcaagagacagctcaatacaacgcaaaactggctatcctaactcagcaagctgataaaatttatgaaaaacacgggattacc
aaagatatcttggcagcttactatatgcaaacaggaatggaagcagattaa

MANYKKITSLSLLTLLSLATFSATQYSKVYAQDPESSSSVNIKTIDGQLAIADKEAEPLYKEMD
SIQMSIEKIKASRFKPAEIAITTEIQQLENLNETLLEKFYQKIGNRIWNTKEEALNLISKTTLSPS
EKELLKDYFNKDEVLQKKLKENDLLIDQETAQYNAKLAILTQQADKIYEKHGITKDILAAYYM
QTGMEAD

SEQ ID 93

ttgaaatctaaaaagtcttatgttttattattagcaccgtttgttctggcttcattttggcagtcaaagatggtgtctgcttcagaaatcgccaat
caaaacgtgacagttgattcaagtgcaaataataacatgtcatctaagttgtctacttcaaatttagatacaattccagaaagtacttctgaa
gtaactgttttggatcagtcgacaaatttagtaacagaaaatgtagtccaagaaaaggcgctagcatcatcagaaatacaaacagatgag
agtatcatagtatcatctccatcaggtgacctcagtgcttcagaagataacacactttctgaagggaatgctttatcagcagtaggggcagta
aaatctagttttcaatcagttaatactgatgtatcaagcaatctcaaaactgctaaacaggaaacggtcgtttctttagctgctcaagtagca
gagcccgtaactgcaactgtagatgacaaaggtattagcattcaatataatgaggcgattccacaagatacaagcattttatttgctgtctgg
ggtgataaacaagatcagaatgatttggtctggtataatgcatcatcaactggctatgcctatgttgatttttcacgccataaagaatatgga
ttataccatattcatacttatgcaaaacgcaatggcaatatgtatggaattagcgctcttcaagtcacacttttgacaccacaaattactagtc
aaatcgctcaaaaggatgccaactctttcacaattacagtatccaatgtcccttctacaatcaccagtgttaagattccagtttggacagataa
agatgaccaaaatgatttgatttggtataatgcccgtcaagtgtcaaaaggaacctatcaagtactggtgaatacagctaatcataataatg
aaaaaggtctttatcacattcatatttatggctatagtacaattttgggtagtcagattggacttgcagccaaaaccttcaataatgtggata
gtcgcccaaatgctacagtatcagttgtaaattatgccgaaaacaaaaccacctttaccgttaatgttgtcggttctacaaatacaaaagtat
taacaggtgttcaaatcgcagtatggtctgaaacaaatggtcaggatgatttaaaatggtataagcctcttgtttctgggaat
agtgctagtcaagtgattgatgttgctaatcatagtaataccagtgatcaatatattattcacgtttatacggattatactgatggaagtcgtg
ttggaacgaatttagggcctataaaattgttaaagaaattctgcctgtcgtaaaacctaacgtaacagttcaaaattaccaagctgacaag
gggttacttgaagtcaaggttcaggaaggtagtaaagcaatctcaaaaataagcgtagcagcatggtcgacttctaatcaaacaaatctcc
attggtatcaagaaattccaatagctggtcaagagacgattattaaagtcaatcaagcctaccatgatttttagttggaaattacactgttc
atacttatattgattatacggacaagtcacgagatggcttcaatctaggaaattatgaatttcctgttaaagttggcctttctgcttcacaagg
aaattatgatattgtcaataaggtcatttacctagatgctggtcatggcggttatgatccaggagcagtttattttgggacatctgaaaaaac
cttgaatttgcaaatgcaaaccttggtaaaaagtaaattagaatctcaaggctacacagtcgtaactacaagaacagatgactcctttacag
atttgcttccacgttcggaaaaagcaaataacagtctttcagatctctttgttagcctccattttaatgcctctacaagttcgcaagcctctgga
attgaaacttattactatgaatactacgaagagtatccttcacgcattaatgagatttttcataatgatcctgaacgtttgagtcgaagtagtg
ttttagccgaagctattcaggcggcgaccactgctaaaactggcgctaaaaacaatggtgttttgagaaatacatttgcagtattaagagaa
acaacagccccagcagtgctagtagaattaggttacatgtcaaatgctagcgagttccaaaatattagcaatgtgaactatcaagaaaaat
tagcacaaggaattgtttcagggattttatcctattatcaaacctacagtgtt

MKSKKSYVLLLAPFVLASFWQSKMVSASEIANQNVTVDSSANNNMSSKLSTSNLDTIPESTSE
VTVLDQSTNLVTENVVQEKALASSEIQTDESIIVSSPSGDLSASEDNTLSEGNALSAVGAVKSSF
QSVNTDVSSNLKTAKQETVVSLAAQVAEPVTATVDDKGISIQYNEAIPQDTSILFAVWGDKQD
QNDLVWYNASSTGYAYVDFSRHKEYGLYHIHTYAKRNGNMYGISALQVTLLTPQITSQIAQKD
ANSFTITVSNVPSTITSVKIPVWTDKDDQNDLIWYNARQVSKGTYQVLVNTANHNNEKGLYHI
HIYGYSTILGSQIGLAAKTFNNVDSRPNATVSVVNYAENKTTFTVNVVGSTNTKVLTGVQIAV
WSETNGQDDLKWYKPLVSGNSASQVIDVANHSNTSDQYIIHVYTDYTDGSRVGTNLGAYKIV
KEILPVVKPNVTVQNYQADKGLLEVKVQEGSKAISKISVAAWSTSNQTNLHWYQEIPIAGQETI
IKVNQAYHDFLVGNYTVHTYIDYTDKSRDGFNLGNYEFPVKVGLSASQGNYDIVNKVIYLDAG
HGGYDPGAVYFGTSEKTLNLQMQTLVKSKLESQGYTVVTTRTDDSFTDLLPRSEKANNSLSD
LFVSLHFNASTSSQASGIETYYYEYYEEYPSRINEIFHNDPERLSRSSVLAEAIQAATTAKTGAK
NNGVLRNTFAVLRETTAPAVLVELGYMSNASEFQNISNVNYQEKLAQGIVSGILSYYQTYSV

SEQ ID 94

atgaaaaaaagaaagaataaatggaggtttttatgattaaaatgagaaaatcacagttgtcagtcagtcttgcccttttgccttactaact
tttgcggcttcacctatttatgccttacaaacgaatcaaaaccaagctgggcaagaagtccaacaagatagtcttgctgtcacggctcatttac
aagctcagaaacctcttttagatattgctattcagataccagctcaactggctaagggaggtcaagcaaaagtggaattgcttgatcaaaca
ggtcaggtcaaaaataccattagctatgacttgcaagcaggatggacacaaatgtcagcctggtttgacatgacaggttacccaagtggtg
attatagtgttaaggttacctacaatggcatcagccaacaatcatcacctattcactattaa

MKKRKNKWRFFMIKMRKSQLSVSLALFALLTFAASPIYALQTNQNQAGQEVQQDSLAVTAHL
QAQKPLLDIAIQIPAQLAKGGQAKVELLDQTGQVKNTISYDLQAGWTQMSAWFDMTGYPSGD
YSVKVTYNGISQQSSPIHY

SEQ ID 100

atgaataccaaaaaaataatgcaatttatacttgcaattaccgtgactctatttgcaactgtcggtatgaaaacggtagctgaaagtttttgg
gctgggcatcatgatattgaaatgattaatcgaaacatagacactttgtctaatcgcattaaaacaaaaaatcagaaaatttcagatttaaa
cgcaagcatttcaactttaaaatcagatattgcttctcaaaacagccaagtgagcgcactgcaacaacaattaatccaagctaatattgata
aacaaaatgagatcaatcaaaaaattaatgaaatcaacgctaaaattgcagaaggtaatcaaaaggttgccgaaaaacaacttgaagtg
gatgccgccaatcaaaaaatagcagaattgaatcaacaagtatcctcattacaagataaattgaatcaaaatgattctcaagcattaagag
atgttcaaaacactcgtcaaaaatctgataaagctgttttagaaacggaa

MNTKKIMQFILAITVTLFATVGMKTVAESFWAGHHDIEMINRNIDTLSNRIKTKNQKISDLNA
SISTLKSDIASQNSQVSALQQQLIQANIDKQNEINQKINEINAKIAEGNQKVAEKQLEVDAANQ
KIAELNQQVSSLQDKLNQNDSQALRDVQNTRQKSDKAVLETE

SEQ ID 105

atgaagaaaaaaacttatttatttgttgctggaatcactgtaacctgtggtactgcattggcgattcatttatcacaaccaaagtcaatacca
atgacaaaatcaggacatgagaaaatgatttcaaaatccccaactaatagtgatgataaatctaggaaaaaagataagggtattgctggt
attgattatcctactagtgatggatttaaactagataagcaatctaaaatcatttctaaaacagacacaggaattattgttgctcatggagat
cattctcactttatttttataaagatttgaaagggactgcatttgcatatttaataccaaatggcgttcaaataactaaaccttttaataggtg
atacaaatgaatcgataaatggacatgggcatcattatgttttcaatccaaaggatattgttgcagaagatgcttttggttatactgtcagac
atgatgatcatttccattatattttaaaatctagtctaggaatgacccctatgttgaccaactataatcaaggccgtcatttccaaagggatag
tcattacaaacctaatgttcaaggaattccaggtcttgattttgctacctctgatggttttcaatttgatggtagcggaattgtaggtaaaaca
aatgatagtatttggttagtcacgatgaccatcttcatcccatttcgtttgatgatttaaggaaaacaggttggggagagatagtcaaaatt
tatgagaaaagagaaattgcaactccccttagtcatgtagcaagcaaggaggacttggttcaaaagaccatagaatatttagcgaaatcat
tggccttaccattatcatctattgaaataatcaaaactgacgatggtaaaattgggtttaaatatcctcatcatgatcatagccatgtcatcat
gttagaagatatcgaaatcggtaaaccaattccagatcctcatcaacttcatcatgccaaagaattggaaaagcatcgcattggcatgaata
cattaagggagatcggctttgatgaagaagtcattcttgatattgttagaacccatgatgcaaaaacagaatttccatcaaatgaaaaaaa
tccggaaaagatgaaggagtggttgaccacagttacaaaattggatttaggaagccgaaaagacccttgaatcgatttggacttcat
ttattacctaatctagagaatttaggaatcggctttacacctatcaaaaatatggagcctgttctacaatttaaaaaattaaaacgactgtta
atgacagcaactggtgttaaaaactatgattttctgaagtacatgccaaatcttgagggattagatatttcacaaaacaacttaaaggattt
gagctttttgacgccttataaacaactcaatctattagctgccgcagataaccaattatcaacattgcaaccattagcggaactgccaaagtt
acaatttttagtattaagtaataataagataaaagatttgagtccattgaaaaatttaacaaggcttcaagaagttcatattgagaacaatc
tggtcagagatttaacccctttaaatgacaaagaaaacttaaaagttttaaatctatccgaaaataggggagttgacttaaagactttgag
gttaccgcttcttgagacacttaccgtaaataaagcatctttgacggatttaaacttttttgaagctaatcctaacctgactgaagtaacagca
acaaaaaatgctattcagaaattagatggcattgagaaagcaaagaaattgcaatttttagatttgcaagaaaataaggttaatcatttaa
acattaaggaaaaacaagagtcactaactttcttgaatctttctgataatgcattggaatcgctcgaaggggtaaatgactttacagctttgg
agacattaagagtggcatcaaataaaatttcgagcttacaccttgaagaaagcaatcagcaagtaaaaagcttagatgtcagttataatca
attgccaaaggaggaattaacattaaatgaaaacgacatacccctggtgttgctcatcattttacagcggttaaggaagggtcaatagag
gggaatccctctctaaatgatgttttagaaagtcaaaatcaaaagaataataaaaaagaa

MKKKTYLFVAGITVTCGTALAIHLSQPKSIPMTKSGHEKMISKSPTNSDDKSRKKDKGIAGIDY
PTSDGFKLDKQSKIISKTDTGIIVAHGDHSHFIFYKDLKGTAFAYLIPNGVQITKPLIGDTNESI
NGHGHHYVFNPKDIVAEDAFGYTVRHDDHFHYILKSSLGMTPMLTNYNQGRHFQRDSHYKP
NVQGIPGLDFATSDGFQFDGSGIVGKTNDSILVSHDDHLHPISFDDLRKTGWGEIVKIYEKREI
ATPLSHVASKEDLVQKTIEYLAKSLALPLSSIEIIKTDDGKIGFKYPHHDHSHVIMLEDIEIGKPI
PDPHQLHHAKELEKHRIGMNTLREIGFDEEVILDIVRTHDAKTEFPSNEKNPEKMKEWLTTV
TKLDLGSRKDPLNRFGLHLLPNLENLGIGFTPIKNMEPVLQFKKLKRLLMTATGVKNYDFLK
YMPNLEGLDISQNNLKDLSFLTPYKQLNLLAAADNQLSTLQPLAELPKLQFLVLSNNKIKDLS
PLKNLTRLQEVHIENNLVRDLTPLNDKENLKVLNLSENRGVDLKTLRLPLLETLTVNKASLTD
LNFFEANPNLTEVTATKNAIQKLDGIEKAKKLQFLDLQENKVNHLNIKEKQESLTFLNLSDN
ALESLEGVNDFTALETLRVASNKISSLHLEESNQQVKSLDVSYNQLPKEELTLNENDIPLGVA
HHFTAVKEGSIEGNPSLNDVLESQNQKNNKKE

SEQ ID 109

atggcaattattttacctgaccttccatatgcatatgatgctcttgagccacaaattgataaagaaacaatgactcttcatcatgacaaacatc
atgcgacatatgttgctaatgccaatgctgcgcttgaaaaacatccagaaattggtgaagatttggtggcgttattatctgatgtgtcatcaa
ttccagaagatattcgtcaagctcttatcaataatggaggcggacatcttaaccatgcacttttttgggaacttctttcacctgagaaaacaga
aatcacttcggaagtagcttctgctattgatgaagcatttgttctttttgatgcatttaaagaaaaatttacagcagcagcaacgggacgtttt
ggatctggttgggcttggttagttgtcaataaagaaggaaaacttgaagtaacttcaactgcaaaccaagatacaccaatttctgaaggta
aacagcctattttgggtcttgatgtatgggaacatgcttattacttaaattatcgtaatgtacgtccaaattacattaaagctttctttgaaatt
attaattggaaaaaggttgatgagctttataaagcagcaaaagcg

**MAIILPDLPYAYDALEPQIDKETMTLHHDKHHATYVANANAALEKHPEIGEDLVALLSDVSSI
PEDIRQALINNGGGHLNHALFWELLSPEKTEITSEVASAIDEAFGSFDAFKEKFTAAATGRFGS
GWAWLVVNKEGKLEVTSTANQDTPISEGKQPILGLDVWEHAYYLNYRNVRPNYIKAFFEIIN
WKKVDELYKAAKA**

SEQ ID 115

atgagaaaacattatgtttcaaaaagtgccatttttttagccatgttagttgcaacaggttcagctcaattcgtaaaagctgagacaccaaca
actacaactagcccagcaacaagtcttactgatgcctctgcaagtacgactccaacaacgaacacgacgtcaactgtgacacctgctcttgat
ccaaatactaatttcaccgttgattctagtgctacaacaagtactactactccaagtccagtggaggcagcagccatctctcctgtgatagcaa
ctgctcaacctacaactaatgtcactagtgctagccttgcgccagcagctaacacaatggcaacaactccagttgaaggccaaacagttgat
gtgcgcatcatctcaaccactgaccttcactctaacttagtcaactatgattactatcaagataaagcatctcaaactatcggtttagcgaaag
ctgccgttcttatcgatcaagcaaaagctgaaaatcctaatgctgttcttgttgataacggcgatatcttacaaggtacaccactcggaacttа
tgaagcattgattgatcctttacaaccaggtgaagtgcacccaatgtacgcagcccttgataaacttggttttgacgcttcaactttaggtaac
cacgaattcaactatggccttaccttcatcgaaaatgccattgcttcagccggactaccaatcctaaatgctaacgtctttgatgcagcaacgg
gagaatacctttttccaaccttacgctatcgttacgaaaagctttacggatgctaatggccaagctgtcgacctaaaaatcggtatcacaggta
ttgtgccacctcaaatcatgctttgggataaggctaacctcgaaggtaaagttacggtcaaagatgccgtgcaagctgtgacagaaatcatt
cctaccatcaaaaatgctggcgctgacatcgttttagtccttgcccacactggtatcggtgatgatgtttatgaaactggtgaagaaaatgtcg
gctaccagattgcaagtcttgctggtgttgacgcggtcgtaacaggtcactcacatgcagaattcccttcaggacaagatacggcttctacg
aatcctataatggtgtcgacggggtgtctggtttaattaacggaacacctgttaccatggcaggaaaatacggggatcat
atcggtattattgatttaaatgtgtcctatacaggtggtaaatggactgttaatcgcgataaaaaccatgcagaaatccgtaaaattgatac
caaatcaaccatcgccgatgctgatattttagctttggctcaagcatctcaccttggaacaattgattacgtgcgtcaaactgttggtgaaaca
actgcaccaattaacagttacttcgctttagtcaaagatgatccatctgttcaaattgtcaataatgcacaactttggtatgccaaacaacaat
tagctggtactccagaagctgacttacctcttctttcagcagcagcaccatttaaagctggtactcgtaatgacccaaccgcttatactgatatc
ccggctggaccaattgccattaaaaacgttgccgacctatacttatatgataatgtcactgctatcctaaaactgacaggtgcagatatcaaa
gaatggttagagatgtcagcaggacaatttaataccatcgacccaaatgtagctggacctcaaaacctagtcaatacggattatagaactta
caactttgatgtgattgatggcgttacttacgagtttgatgtaacacaacctaacaagtatgatgccaaaggtaatcttcttaaccctaatgct
agtcgtgttcgtaaccttaaattccaaggtaaagaaatcgatccaaatcaagaattcatggttgtcactaataactaccgtgctagtggaagt
ttcccagggtaaaaaatgcaaccattaatcgattgcttaaccttgaaaatcgacaagccatcatcaattatatcgtttctgaaaaaaccatt
aacccaagtgcagataacaactggtactttgcagataccattcaaggacttgatttacacttcttaagtgcagatacttctaagaatttaattg
gtgacaaagctgatatttcttataccggcccttctactattgaaggttttggtgacttcgtctttacatatgttaaaccagaattaccagtagcc
actccggaaacaccacaagaaactggtagccaattgactgaaaaccgtcgtcaagaaattcatcaattagctacgcgtgtttacaatcaaac
aaaagcgacatcatcaagtactactaaggctgaattaccaaaagctggtagccaagagtctaaaggtttattcttcatg
ggcttaagcttacttggtttagccggattaatcacgaaaaaagaagaaagacaa

MRKHYVSKSAIFLAMLVATGSAQFVKAETPTTTTSPATSLTDASASTTPTTNTTSTVTPALDPN
TNFTVDSSATTSTTTPSPVEAAAISPVIATAQPTTNVTSASLAPAANTMATTPVEGQTVDVRIIST
TDLHSNLVNYDYYQDKASQTIGLAKAAVLIDQAKAENPNAVLVDNGDILQGTPLGTYEALIDP
LQPGEVHPMYAALDKLGFDASTLGNHEFNYGLTFIENAIASAGLPILNANVFDAATGEYLFQP
YAIVTKSFTDANGQAVDLKIGITGIVPPQIMLWDKANLEGKVTVKDAVQAVTEIIPTIKNAGADI
VLVLAHTGIGDDVYETGEENVGYQIASLAGVDAVVTGHSHAEFPSGQDTGFYESYNGVDGVS
GLINGTPVTMAGKYGDHIGIIDLNVSYTGGKWTVNRDKNHAEIRKIDTKSTIADADILALAQAS
HLGTIDYVRQTVGETTAPINSYFALVKDDPSVQIVNNAQLWYAKQQLAGTPEADLPLLSAAAP
FKAGTRNDPTAYTDIPAGPIAIKNVADLYLYDNVTAILKLTGADIKEWLEMSAGQFNTIDPNVA
GPQNLVNTDYRTYNFDVIDGVTYEFDVTQPNKYDAKGNLLNPNASRVRNLKFQGKEIDPNQE
FMVVTNNYRASGSFPGVKNATINRLLNLENRQAIINYIVSEKTINPSADNNWYFADTIQGLDL
HFLSADTSKNLIGDKADISYTGPSTIEGFGDFVFTYVKPELPVATPETPQETGSQLTENRRQEI
HQLATRVYNQTKATSSSTTKAELPKAGSQESKGLFFMGLSLLGLAGLITKKEERQ

157

PROTEÍNAS DE *STREPTOCOCCUS* INMUNOGÉNICAS

La invención se relaciona con el campo de la medicina. Más específicamente, la invención se relaciona con proteínas de *Streptococcus* inmunogénicas y partes inmunogénicas, derivados y análogos de los mismos.

En género *Streptococcus* está comprendido de una amplia variedad de bacterias patogénicas y bacterias comensales Gram-positivas que habitan una amplia variedad de anfitriones, que incluye humanos, caballos, cerdos y vacas. Dentro del anfitrión, se encuentra frecuentemente que los estreptococos colonizan las superficies de la mucosa del tracto respiratorio superior. Sin embargo, en ciertas circunstancias los estreptococos también pueden originar enfermedades que varían de subagudas a agudas o aún crónicas.

Hasta ahora muchas vacunas comerciales contra *Streptococcus* se basan en vacunas bacterianas de células completas. Generalmente tales vacunas bacterianas producen protección significativa contra la exposición a serotipos homólogos, pero no protegen contra exposición a serotipos heterólogos. La vacunación con *Streptococcus* de células completas resulta frecuentemente n una respuesta inmune que se dirige contra la misma cepa de *Streptococcus*, pero que no se dirige (suficientemente) contra otras cepas de *Streptococcus*, dejando solos otros serotipos de *Streptococcus*. Como un resultado, muchas vacunas proporcionan protección insuficiente contra cepas heterólogas y/o serotipos debido a que la vacunación contra una cepa de *Streptococcus* no es generalmente eficiente en contrarrestar la infección por otra cepa de *Streptococcus*. Más aún, la vacunación contra un serotipo *Streptococcus* generalmente no es eficiente en contrarrestar la infección por otro serotipo de *Streptococcus*. Por lo tanto, se desea

158

las composiciones inmunogénicas capaces de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos cepas de *Streptococcus*, preferiblemente contra dos serotipos de *Streptococcus*.

Es un objeto de la presente invención proporcionar proteínas de *Streptococcus* y partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de los mismos, y moléculas de ácido nucleico que los codifican, que sean capaces de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos cepa de *Streptococcus*.

La invención proporciona un método para identificar una proteína de *Streptococcus* que es capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos cepas de *Streptococcus*, el método comprende:

a) identificar por lo menos parte de una proteína secretada, una proteína asociada con superficie y/o una proteína con por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano;

b) seleccionar por lo menos una proteína identificada en la etapa a) que se conserva sobre por lo menos dos cepa de *Streptococcus*; y

c) determinar si por lo menos una proteína seleccionada en la etapa b) o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo es capaz de unir específicamente un anticuerpo y/o una célula inmune de un animal infectado por una primera cepa de *Streptococcus* y un anticuerpo y/o células inmune de un animal infectado por una segunda cepa de *Streptococcus*. Dicha primera cepa de *Streptococcus* y dicha segunda cepa de *Streptococcus* son preferiblemente de la misma especie de *Streptococcus*. Preferiblemente, dicha proteína con por lo menos 50% de

identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano que tiene por lo menos 60%, más preferiblemente por lo menos 70%, más preferiblemente por lo menos 75%, más preferiblemente por lo menos 80% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano.

De acuerdo con la presente invención, se identifica por lo menos una proteína de *Streptococcus* que es capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos cepas de *Streptococcus*. Dicha proteína es adecuada para inmunizar un individuo y/o animal no humano debido a que es capaz de provocar una amplia respuesta inmunológica. Por lo tanto, la presene invención obvia la necesidad de proporcionar una vacuna para cada una y todas las cepas de *Streptococcus* y/o serotipos. El uso de una proteína de *Streptococcus* inmunogénica de la invención ahorra por lo tanto tiempo y dinero. De manera importante, una proteína de *Streptococcus* inmunogénica de la invención es en principio capaz de provocar una respuesta inmunológica contra una cepa de *Streptococcus* que no se conoce aún, o contra la que aún no hay disponible una vacuna específica (por ejemplo una cepa que ha evolucionado recientemente en la naturaleza). Preferiblemente, una proteína de *Streptococcus* de la invención es capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos serotipos de *Streptococcus*. Una modalidad preferida de la invención proporciona por lo tanto un método para identificar una proteína *Streptococcus* que es capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos serotipos de *Streptococcus*, el método comprende:

a) identificar por lo menos parte de una proteína secretada, una proteína asociada con superficie y/o una proteína que tiene por lo menos 50% identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano;

b) seleccionar por lo menos una proteína identificada en la etapa a) que se conserva sobre por lo menos dos serotipos de *Streptococcus*; y

c) determinar si por lo menos una proteína seleccionada en la etapa b) o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mimo es capaz de unir específicamente un anticuerpo y/o una célula inmune de un animal infectado mediante un primer serotipo de *Streptococcus* y una anticuerpo y/o célula inmune de un animal infectado por un segundo serotipo de de *Streptococcus*.

Se define aquí una respuesta inmune contra por lo menos dos cepa de de *Streptococcus* y/o serotipos de *Streptococcus* como una respuesta inmunológica humoral y/o celular dirigida contra *Streptococcus* de por lo menos dos cepas diferentes y/o serotipos diferentes. Dicha repuesta inmune se provoca por ejemplo en un animal no humano. También es posible provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus* en un individuo humano con el fin de evitar y/o contrarrestar una enfermedad relacionada con *Streptococcus*. Una respuesta inmunológica humoral conduce a la producción de anticuerpos, aunque una respuesta inmunológica celular mejora predominantemente la formación de células inmunológicas reactivas tal como linfocitos T. En general, ambas partes de la respuesta inmunológica son provocadas por la administración de una proteína inmunogénica o parte inmunogénica de la misma. Una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas/serotipos de *Streptococcus* comprende preferiblemente la producción de anticuerpos. Dicha respuesta inmunológica es preferiblemente capaz de por lo menos en parte reducir el número de organismos de *Streptococcus* en un individuo humano y/o animal no humano. Dicha respuesta inmunológica es

preferiblemente adicionalmente capaz de por lo menos en parte contrarrestar un trastorno originado por *Streptococcus.*

Una cepa de *Streptococcus* se puede identificar por sus características morfológicas, bioquímicas y serológicas, así como se sabe en la técnica. Un serotipo de *Streptococcus* es un grupo de *Streptococcus* cuya clasificación se basa en la presencia de polisacáridos antigénicos específicos. La clasificación de serotipos de *Streptococcus* también se conoce bien en la técnica.

Un método de la invención comprende identificar por lo menos parte de una proteína secretada, una proteína asociada con superficie y/o una proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano. Dicha proteína se identifica de varias formas. En una realización de la invención se utiliza un método genómico. Se identifica un gen que codifica una proteína secretado y/o una proteína asociada con superficie, por ejemplo al buscar un motivo de dicha proteína secretada y/o proteína asociada a superficie. Dicho motivo comprende preferiblemente un sitio de unión a lípido, un sitio de división de peptidasa de señal y/o un sitio de unión de sortasa. Por supuesto, es posible buscar otros motivos conocidos en la técnica. Una modalidad de la invención proporciona por lo tanto un método de la invención en donde dicha proteína secretada y/o proteína asociada a superficie se identifica al identificar en por lo menos parte de la secuencia genómica de un *Streptococcus* un gen que comprende un motivo de una proteína secretada y/o proteína asociada a superficie. Adicionalmente o alternativamente, un gen que codifica una proteína secretada y/o una proteína asociada a superficie se identifica mediante uno o más de otros métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una vez un gen de una especie de *Streptococcus* que codifica una proteína secretada y/o una proteína

asociada a superficie se conoce, es posible detectar otra secuencia genómica de *Streptococcus* para la presencia de un gen con un alto % de identidad de secuencia.

En una realización, tal un método de detección comprende un método en el que se detecta dicha otra secuencia genómica de *Streptococcus* por su capacidad de hibridar a una secuencia de nucleótido que codifica una proteína secretada y/o proteína asociada a superficie. Por lo tanto la invención suministra un método de acuerdo con la invención, en donde dicha proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano se identifica al identificar en por lo menos parte de la secuencia genómica del *Streptococcus* un gen que es capaz de hibridar a cualquiera de las secuencias de ácido nucleico listados en la Fig. 4 a 65° C en un amortiguador que tiene fosfato de sodio 0.5 M, EDTA 1 mM, y 7% de dodecil sulfato de sodio en un pH de 7.2, en donde la molécula de ácido nucleico permanece hibridada después de lavar dos veces con un amortiguador que contiene 40 mM de fosfatos de sodio (pH 7.2), EDTA 1 mM y 5% de dodecil sulfato de sodio durante 30 minutos a 65° C y; lavar dos veces con un amortiguador que contiene 40 mM de fosfatos de sodio (pH 7.2), 1 mM EDTA y 1% de dodecil sulfato de sodio durante 30 minutos a 65° C. Preferiblemente, dicha proteína con por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano tiene por lo menos 60%, más preferiblemente por lo menos 70 %, más preferiblemente por lo menos 75%, más preferiblemente por lo menos 80% identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano.

La técnica proporciona adicionalmente varios métodos para determinar si la proteína de *Streptococcus* tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano. Por ejemplo, la secuencia de aminoácido de

una proteína de *Streptococcus* se compara con una secuencia de aminoácido de un factor de virulencia bacteriano. También es posible aplicar un método genómico. Un gen que codifica una proteína *Streptococcus* que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano se identifica por ejemplo al detectar una secuencia genómica de *Streptococcus* para una secuencia de nucleótido que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un gen bacteriano que codifica un factor de virulencia. Una modalidad de la invención suministra por lo tanto un método de la invención en donde una proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano se identifica al identificar en por lo menos parte de la secuencia genómica de un *Streptococcus* un gen que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un gen de factor de virulencia bacteriano. Sin embargo, se conocen en la técnica muchos métodos alternativos para identificar si una proteína *Streptococcus* tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano.

Una vez se ha identificado por lo menos un gen *Streptococcus* que codifica una proteína secretada, una proteína asociada a superficie y/o una proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano, se determina preferiblemente si por lo menos uno de dichos genes se conserva sobre por lo menos dos de las cepas de *Streptococcus*. Se conserva un gen de una primera cepa de *Streptococcus* sobre por lo menos dos cepas de *Streptococcus* si un genoma de una segunda cepa de *Streptococcus* comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia con dicho gen de dicha primer cepa de *Streptococcus*. Preferiblemente, dicha secuencia de ácido nucleico tiene por lo menos 70%, más preferiblemente por lo menos 75%, más preferiblemente por lo menos 80% más

[64]

preferiblemente por lo menos 90%, más preferiblemente por lo menos 95% de identidad de secuencia con dichos gen. El término "identidad de secuencia" se refiere al porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico o secuencias de amino ácidos. Dos secuencias de ácido nucleico tienen por lo menos 60% de identidad de secuencia una con la otra cuando dichas secuencias exhiben por lo menos 60% de identidad de secuencia después de alineación de las secuencias e introducción de espacios, si es necesario, para alcanzar el porcentaje máximo de identidad de secuencia. Los métodos y programas de computador para la alineación se conocen bien en la técnica. Un programa de computador que se puede utilizar o adaptar para propósitos de determinar si una secuencia candidata cae dentro de ésta definición es "Align 2", de Genentech, Inc., que se registro con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los Estados Unidos, Washington, D. C. 20559, en Dic. 10, 1991.

De acuerdo con una realización de la invención, si un gen de la invención se conserva sobre por lo menos dos cepas de *Streptococcus*, la proteína codificada por dicho gen es un buen candidato para evaluar si dicha proteína, o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo, es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra más de una cepa de *Streptococcus*. Dicha primer cepa de *Streptococcus* y dicha segunda cepa de *Streptococcus* son preferiblemente de la misa especie de *Streptococcus*.

Preferiblemente, se determina si dicha gen se conserva sobre por lo menos dos serotipos de *Streptococcus*, con el fin de identificar una buena proteína candidato (codificada por dicho gen) que se prueba por su capacidad de provocar una respuesta inmunológica contra más de un serotipo de *Streptococcus*. Se prefiere por lo tanto un método de la invención que comprende adicionalmente seleccionar

un gen que se conserva sobre por lo menos dos cepas de *Streptococcus* y/o serotipos. Una vez se identifica un gen conservado sobre por lo menos dos cepas de *Streptococcus*/serotipos, se obtiene preferiblemente una proteína codificada por dicho gen. Adicionalmente, o alternativamente, se obtiene una parte inmunogénica derivado y/o análogo de dicha proteína. La técnica proporciona varios métodos para obtener una proteína codificada por un gen, o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo. Dicho gen se expresa por ejemplo mediante un sistema de expresión adecuado. Ejemplos no limitantes de sistemas de expresión comprenden células anfitrionas escarióticas tal como levadura y células anfitrionas procarióticas tal como *Escherichia Coli*. Preferiblemente, un gen de la invención que codifica una proteína secretada, una proteína asociada con superficie y/o una proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano, cuto gen se conserva sobre por lo menos dos cepas de *Streptococcus*, se expresan en un sistema de expresión procariótico. Un sistema de expresión procariótico se prefiere ya que una proteína *Streptococcus* (procariótica) se expresa en principio mejor en un sistema de expresión procariótico. Más aún, un sistema de expresión procariótico es generalmente más fácil de configurar y utilizar.

Un método de la invención comprende determinar si por lo menos una proteína de la invención o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo y/o célula inmunológica de un animal infectado mediante una primera cepa de *Streptococcus* y un anticuerpo y/o células inmunológica de un animal infectado por una segunda cepa de *Streptococcus*. Preferiblemente, se determina si por lo menos una proteína de la invención o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo y/o células inmunológica de un animal infectado

por un primer serotipo de *Streptococcus* y un anticuerpo y/o célula inmunológica de un animal infectado por un segundo serotipo de *Streptococcus*. Se conocen en la técnica muchos métodos para desarrollar dicha prueba. Preferiblemente, se utiliza el suero de por lo menos dos animales infectados mediante por lo menos dos cepas diferentes de *Streptococcus*. Alternativamente, se utiliza el suero de sólo un animal, dicho animal se infecta con por lo menos dos cepas diferentes de *Streptococcus*. De acuerdo con una modalidad, un animal no humano se infecta mediante por lo menos una primera cepa de *Streptococcus* y/o serotipo, y un segundo animal no humano se infecta mediante por lo menos una segunda cepa de *Streptococcus* y/o serotipo. Dichas cepas de *Streptococcus* y/o serotipos se administran por ejemplo intravenosamente a dicho animal. Posteriormente, de acuerdo con una modalidad, se recolecta el suero de dichos animales que comprende anticuerpos específicos de *Streptococcus* y/o células inmunológicas. Dicho suelo se procesa opcionalmente antes de uso. Por ejemplo, los anticuerpos y/o células inmunológicas están por lo menos en parte concentradas y/o aisladas. Una proteína de la invención y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo se aísla preferiblemente y/o se produce recombinantemente y se incuba posteriormente con dicho suero – o con (parcialmente) anticuerpos aislados y/o células inmunológicas – derivadas de dichos animales. Es posible administrar suero, anticuerpos y/o células inmunes derivadas de un primer animal junto con suero, anticuerpos y/o células inmunológicas derivadas de un segundo animal. Alternativamente, el suero, los anticuerpos y/o células inmunológicas derivadas de un primer animal se administran en primer lugar, después que se agregan suero, anticuerpos y/o células inmunológicas de un segundo animal. En aún otra modalidad, el suero, los anticuerpos y/o células inmunes de un primer animal se administran a una tanda separada que comprende por lo menos una proteína y/o parte inmunogénica, derivado y/o análogo de acuerdo con la invención y suero,

anticuerpos y/o células inmunológicas de un segundo animal se administran a otra tanda que comprende por lo menos una proteína y/o parte inmunogénica, derivado y/o análogo de acuerdo con la invención. Después de incubación de dicho suero, anticuerpos y/o células inmunes se lavan y se unen a anticuerpos y/o células inmunes que se visualizan, utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos ligados se incuban por ejemplo con un segundo anticuerpo capaz de unirse específicamente a dichos anticuerpos ligados, cuyo segundo anticuerpo se conjuga con peroxidasa de rábano. Después de separación los segundos anticuerpos se lavan, se administra peróxido de hidrógeno. La descomposición del peróxido de hidrógeno mediante peroxidasa de rábano se acopla a la oxidación de un compuesto cromogénico, de tal manera que se hace visible la redacción.

Si una proteína de la invención y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo parece estar ligado específicamente mediante un anticuerpo y/o una célula inmune provocada por una primera cepa de *Streptococcus*, y mediante un anticuerpo y/o célula inmunológica provocada por una segunda cepa de *Streptococcus*, esto indica que dicha proteína, parte inmunogénica, derivado y/o análogo es capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos cepas de *Streptococcus*.

En una modalidad preferida se utiliza un anticuerpo y/o célula inmunológica derivada de un suero convaleciente de un animal que se infecta con un *Streptococcus*. Se deriva un suero convaleciente de un animal que ha contrarrestado eficientemente su infección. Por lo tanto, un suero convaleciente de una animal que se ha infectado con *Streptococcus* comprende anticuerpos y/o células inmunológicas que son capaces de proteger dicho animal contra una exposición a la misma cepa de *Streptococcus*. Por lo tanto, la incubación con un

medio de convaleciente se prefiere con el fin de determinar si una proteína y/o parte inmunogénica, derivado y/o análogo de acuerdo con la invención es capaz de provocar una respuesta inmunológica protectora.

Una modalidad de la invención proporciona así un método para identificar una proteína de *Streptococcus* que es capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos cepas de *Streptococcus*, el método comprende:

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

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

- determinar si una proteína es capaz de ligar un anticuerpo y/o célula inmunológica de un animal infectado mediante una primera cepa de *Streptococcus* y/o serotipo y un anticuerpo y/o célula inmunológica de un animal infectado mediante una segunda cepa de *Streptococcus* y/o serotipo.

Las proteínas de *Streptococcus* se obtienen en varias formas. Preferiblemente, las proteínas secretadas, proteínas asociadas con superficie y/o proteínas que tienen por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano se aíslan de un cultivo de *Streptococcus*. En una modalidad las proteínas asociadas con superficie se pelan del *Streptococcus* utilizando por ejemplo lisozimas. En una modalidad las proteínas de *Streptococcus* se producen recombinantemente utilizando por lo menos una secuencia de ácido nucleico que

codifica por lo menos una de dichas proteínas. Como se explico anteriormente, un gen que codifica una proteína secretada, unas proteínas asociadas a superficie y/o una proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano se utilizan preferiblemente. Más preferiblemente, dicho gen se conserva sobre por lo menos dos cepas de *Streptococcus* y/o serotipos.

Alternativamente, o adicionalmente, se genera una proteína de *Streptococcus* o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de éste utilizando otro método conocido en la técnica. Por ejemplo, se genera una proteína de *Streptococcus* inmunogénica o péptido utilizando una técnica de síntesis común tal como síntesis de fase sólida. Como otro ejemplo, se aísla una proteína de *Streptococcus* de un *Streptococcus*, o se hace recombinantemente, después de lo cual se modifica con el fin de producir una parte inmunogénica, derivado y/o análogo.

En una modalidad preferida las proteínas de *Streptococcus* se separan sobre un gel de poliacrilamida y se incuban posteriormente con un anticuerpo y/o célula inmunológica de un animal infectado mediante una primera cepa de *Streptococcus* y/o serotipo y un anticuerpo y/o célula inmunológica de un animal infectado mediante una segunda cepa de *Streptococcus* y/o serotipo. Preferiblemente se utiliza un gel de poliacrilamida bidimensional.

En una modalidad preferida se identifica una proteína de *Streptococcus* que es capaz de provocar anticuerpos que inducen opsonofagocitosis. La opsonofagocitosis es un proceso natural en donde un microorganismo se opsoniza por opsoninas, después que dicho microorganismo se fagocitisa mediante una células fagocítica y se sacrifica. Muchos microorganismos necesitan ser opsonizados mediante opsoninas para mejorar su fagocitosis. La opsonización es

un proceso para hacer un microorganismo más susceptible para la captación por un fagocito. En dicho proceso, el anticuerpo opsonizantes y/o proteínas se unen a dichos microorganismos, facilitando por lo tanto la captación de dichos microorganismos por dichos fagocitos. Por lo tanto, una proteína de *Streptococcus* de la invención o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo capaz de provocar opsonofagocitosis que incluye anticuerpos se prefiere debido a la administración de tal proteína y/o parte inmunogénica, derivado y/o análogo con un animal resulta en la presencia de anticuerpo que inducen opsonofagocitosis en dicho animal capaz de de fagocitosis de *Streptococcus.*

Una proteína de *Streptococcus* de la invención o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de la misma es capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus*. Con el fin de provocar aún una respuesta inmunológica más amplia, se prefiere identificar por lo menos dos proteínas de *Streptococcus*, y/o una parte inmunogénica derivado y/o análogo de por lo menos una de dichas proteínas. Más preferiblemente, se identifica por lo menos tres proteínas diferentes de *Streptococcus,* y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de por lo menos una de dicha proteínas, etcétera. El mayor número de proteínas de *Streptococcus* y/o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de la presente invención que se identifican, se provoca una respuesta inmunológica más amplia.

En otra modalidad preferida se identifica por lo menos una proteína de *Streptococcus* y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de acuerdo con la invención que es capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos tres cepas de *Streptococcus*. Dicha proteína y/o parte inmunogénica, derivado y/o análogo es particularmente adecuado para provocar una amplia respuesta inmune

en un individuo humano y/o un animal no humano. Más preferiblemente por lo menos una proteína de *Streptococcus* y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de acuerdo con la invención se identifica que es capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos tres serotipos de *Streptococcus.*

Una parte inmunogénica de una proteína se identifica como una parte de una proteína que es capaz de provocar una respuesta inmune en un individuo y/o un animal no humano. Preferiblemente dicha parte inmunogénica es capaz de provocar la misma respuesta inmune en clase, aunque no necesariamente en cantidades, como dicha proteína. Una parte inmunogénica de una proteína comprende preferiblemente uno o más epítopos de dicha proteína. Un epítopo de una proteína se define como una parte de dicha proteína, por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, capaz de provocar un anticuerpo específico y/o célula inmunológica capaz de unirse específicamente a dicho epítopo. Existen dos clases diferentes de epítopos: epítopos lineales y epítopos conformacionales. Un epítopo lineal comprende una tira de aminoácidos consecutivos. Un epítopo conformacional se forma por varias tiras de aminoácidos consecutivos que se doblan en posición y forman juntos un epítopo en una proteína plegada de manera apropiada. Una parte inmunogénica de la invención es capaz de comprender uno, o ambas, de dichas clases de epítopos.

Una parte inmunogénica de una proteína comprende por lo menos 5 residuos de aminoácidos. Preferiblemente dicha parte inmunogénica comprende por lo menos 10, más preferiblemente por lo menos 15, más preferiblemente por lo menos 25 y más preferiblemente por lo menos 30 aminoácidos consecutivos. Dicha parte inmunogénica comprende preferiblemente a lo sumo aproximadamente 500 residuos de aminoácidos, más preferiblemente a lo sumo 250 residuos de

172

aminoácidos, dependiendo de la clase de proteína de la que se deriva dicha parte inmunogénica.

Un derivado de una proteína se define como una molécula que tiene las mismas propiedades inmunogénicas en clase, no necesariamente en cantidad. Una persona experta en la técnica es capaz de alterar una proteína de tal manera que las propiedades inmunogénicas de dicha molécula sean esencialmente de la misma clase, no necesariamente en cantidad, según se compara con dicha proteína. Se proporciona por ejemplo un derivado de una proteína al mutar por lo menos un residuo de aminoácido de dicha proteína y/o al reemplazar un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido. Preferiblemente, se hacen sustituciones de aminoácido conservadoras, como por ejemplo reemplazo de un aminoácido que comprende una cadena lateral ácida por otro aminoácido que comprende una cadena lateral ácida, el reemplazo de un aminoácido voluminoso por otro aminoácido voluminoso, el reemplazo de un aminoácido que comprende una cadena lateral básica por otro aminoácido que comprende una cadena lateral básica, etc. Un experto en la técnica será capaz de generar compuestos análogos de una proteína. Esto se hace por ejemplo a través de detección de una colección de péptidos o mediante programas de cambio de péptidos. Un análogo de acuerdo con la invención tiene esencialmente las mismas propiedades inmunogénicas de dicha proteína en clase, no necesariamente en cantidad. Una análogo de una proteína de la invención comprende por ejemplo una proteína de fusión y/o proteína quimérica.

Con el fin de ser capaz de provocar una respuesta inmune, una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de acuerdo con la invención se suministra preferiblemente con las características apropiadas para permitir la producción de

anticuerpos y/o células inmunes. Dichas características, que se conocen bien en la técnica, incluyen por ejemplo secuencias de flanqueo adecuadas y/o sitios de división proteolíticos. Alternativamente, o adicionalmente, una proteína, parte inmunogénica, derivado y/o análogo de acuerdo con la invención se proporciona preferiblemente con un portador inmunogénico.

Una vez se administra una proteína o una parte inmunogénica, derivado, y/o análogo de acuerdo con la invención a un individuo humano o un animal humano, está usualmente en riesgo de degradación originada por un número de fuerzas diferentes, tal como por ejemplo proteólisis, desdoblamiento, valores de pH extremos, detergentes y altas concentraciones de sal. Para prolongas la vida de una proteína o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo, su resistencia a la degradación se mejora preferiblemente, por ejemplo al sintetizar un péptido con una carboxamida de terminal C y/o acetilar el extremo del terminal N de un péptido con el fin de mantener las características de carga negativas. En una modalidad la resistencia a la degradación se mejora adicionalmente al mutar una proteína o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de acuerdo con la invención de tal manera que un proceso de desdoblamiento local produce dicha proteína o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo susceptible a autolisis y se inhibe por lo menos en parte. Se conocen estrategias de mutación estabilizantes y se describen por ejemplo en Matthews (1991), Alber (1991), Vriend and Eijsink (1993) y Fersht and Serrano (1993).

Una proteína secretada se define como una proteína que se produce naturalmente en una célula y/o organismo y se secreta por lo menos en parte de dicha célula y/u organismo en su medio ambiente. Por lo tanto, si se cultivas estreptococos, una proteína secretada está por lo menos en parte en por lo menos una parte del

medio de cultivo, en por lo menos en algún punto de tiempo. Una proteína secretada no necesita ser producida y/o secretada continuamente. Una proteína secretada se puede producir sólo por ejemplo y/o secretada durante una cierta fase de un ciclo de vida bacteriano. Adicionalmente, la producción y secreción de una proteína secretada no se necesita que ocurra al mismo tiempo. Por ejemplo, algunas proteínas secretadas se acumulan en primer lugar dentro de una célula y se secretan en un punto de tiempo posterior.

Una proteína asociada a superficie define como una proteína que forma partes de una superficie de una célula, o que se adhiere a una superficie de una célula. Si dicha célula asociada a superficie se adhiere a una superficie de una célula, se adhiere directamente o indirectamente. La adhesión indirecta involucra por ejemplo la presencia de por lo menos un ligador.

El término "proteína aislada" se refiere a una proteína que se aísla por lo menos en parte de su ambiente natural, y/o con una proteína que está desprovista de por lo menos parte de una secuencia asociada normalmente con ésta en la naturaleza.

El término "proteína recombinante" se refiere a una proteína que se produce por un sistema de inspección aislado y/o artificial, utilizando preferiblemente una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína. Dicha secuencia de ácido nucleico se liga preferiblemente operablemente con por lo menos una secuencia reguladora tal como por ejemplo un promotor, un mejorador y/o un terminador. Preferiblemente dicha secuencia reguladora es inducible, de tal manera que es posible controlar el grado de expresión de dicha proteína. En una modalidad dicha secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico

exógena. Una secuencia de ácido nucleico exógena es una secuencia de ácido nucleico que está presente en un sitio en un genoma del organismo en donde dicha secuencia de ácido nucleico no está presente de manera natural.

Después una proteína *Streptococcus* es capaz de provocar una respuesta inmune contra de por lo menos dos cepas *Streptococcus* y/o serotipos se identifican mediante un método de la invención, que se produce preferiblemente. La proteína producida es por ejemplo adecuada para regenerar una composición inmunogénica y/o provocar una respuesta inmune o por lo menos dos cepas de *Streptococcus* y/o serotipos en un animal. Como se bosquejo anteriormente, se conocen en la técnica varios métodos para producir una proteína, tal como por ejemplo producción recombinante. Por lo tanto la invención proporciona un método para producir por lo menos una proteína identificada por un método de la invención. Una proteína de *Streptococcus* que es capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus* se pueden obtener mediante un método de la invención que también se suministra por aquí.

Una proteína de *Streptococcus* y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de acuerdo con la invención es particularmente adecuada para preparar una composición inmunogénica. Dicha composición inmunogénica es capaz de provocar una amplia respuesta inmunológica humoral y/o celular contra por lo menos dos cepas de *Streptococcus*. Preferiblemente una proteína *Streptococcus* y/o parte inmunogénica parte derivado y/o análogo capaz de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos serotipos de *Streptococcus* se utiliza para preparar una composición inmunogénica, de tal manera que se alcanza una amplia respuesta inmunológica contra por lo menos dos serotipos de

Streptococcus. También se proporciona por lo tanto el uso de una proteína que se puede obtener mediante un método de la invención, o una parte inmunogénica, derivado y /o análogo del mismo, para la preparación de una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra de por lo menos dos cepas de *Streptococcus* y/o serotipos, así como también una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas de *Streptococcus* y/o serotipos que comprende por lo menos una proteína aislada y/o recombinante que se puede obtener mediante un método de la invención, o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo dl mismo. Con el fin de proporcionar una protección más amplia, utiliza preferiblemente por lo menos dos o más proteínas y/o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de la invención para la preparación de una composición inmunogénica. En una realización, se utiliza una combinación de por lo menos una proteína y por l menos una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de acuerdo con la invención para la preparación de una composición inmunogénica.

A pesar de una protección más amplia, el uso de por lo menos dos proteínas y/o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de la invención se reduce la oportunidad del desarrollo de mutantes de escape de organismos *Streptococcus*. Los mutantes de escape de organismos bacterianos se desarrollan generalmente bajo tensión ambiental, por ejemplo en la presencia de antibióticos y/o en la presencia de anticuerpos contra un epítopo de dicho organismo. Mediante la variación natural en la población de un organismo algunos organismos de escape del efecto inhibidor de dicha tensión ambiental tal como la presencia de antibióticos y/o anticuerpos, son capaces de multiplicación. La oportunidad de desarrollo de un mutante de escape para varios epítopos diferentes en un

momento es más pequeño que la oportunidad de desarrollo de un mutante de escape solo para un epítopo.

Por lo tanto, una composición inmunogénica de la invención comprende preferiblemente por lo menos dos proteínas recombinantes y/o aisladas, y/o por lo menos una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo, que se puede obtener mediante un método de la invención. Con el fin de evitar mejor la formación de mutantes de escape una proteína de la invención comprende preferiblemente una proteína esencial. Esta es una proteína que es importante – preferiblemente esencial - para el metabolismo, supervivencia y/o multiplicación de *Streptococcus*. Por lo tanto, un posible mutante de escape con una proteína esencial alterada es menos viable – todo caso -.

Las tablas 5 y 6 comprenden una lista de proteínas *Streptococcus uberis* preferida que se identifican por un método de la invención. Estas proteínas, o por lo menos una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de la misma, son adecuadas para la preparación de una composición inmunogénica de la invención. Un uso de la invención en donde dicha proteína se selecciona de la tabla 5 y/o tabla 6 también se proporciona, así como también una composición inmunogénica de la invención que comprende por lo menos una proteína aislada y/o recombinante como se describe en la tabla 5 y/o tabla 6, o una parte inmunogénica derivado y/o análogo del mismo. Con el fin de proporcionar aun una protección más amplia, dicha composición inmunogénica comprende preferiblemente por lo menos dos proteínas como se describe en la tabla 5 y/o tabla 6, y/o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de los mismos. Más preferiblemente, dicha composición inmunogénica comprende por lo menos tres proteínas como se describe en la

tabla 5 y/o tabla 6, y/o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de los mismos.

En una modalidad preferida, por lo menos uno, por lo menos dos o por lo menos tres proteínas se describen en la tabla 5 y/o tabla 6 y se toman de los grupos que consisten de P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, P105, proteína de exclusión de superficie, factor disparador (ropA), y quinasa difosfato nucleósido. Estas proteínas se reconocen por anticuerpos presentes en el suero de animales infectados con *S. uberis* estas proteínas se expresan in vivo y son inmunogénicas en vacas, o son de reactividad cruzada entre por lo menos dos cepas *S. uberis* como se describe en la tabla 5. La numeración de las anteriores proteínas, caracterizadas por ejemplo en la tabla 5, se refieren a las proteínas descritas en por ejemplo las tablas 1, 2, y 3 que muestran ejemplos de proteínas de superficie común uberis adicionalmente, la figura 4 muestra ejemplos no limitantes de secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos de estos seleccionados de proteínas de superficie putativa/factores de virulencia de *S. uberis*.

Las proteínas que se conserva grandemente, expresadas en vivo y altamente inmunogénicas, tal como proteínas que se reconocen por el suero de convalecientes de vacas infectadas con diferentes cepas como se muestra en el ejemplo 11, son especialmente útiles en una composición inmunogénica de acuerdo con la invención. Por lo tanto en una modalidad mas preferida, la selección de proteínas de la tabla 5 y/o 6 comprenden una proteína seleccionada del grupo que consiste P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P28, P54, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, P105. Como se muestra en el ejemplo 11, la última selección se reconoce mediante todo el suero de convalecientes utilizados, que

indica que estos antígenos se expresan mediante todas las cepas de *S. uberis* que originan la respectiva infección, que estos antígenos se expresan durante la infección en el anfitrión y que estos antígenos son altamente inmunogénicos.

Aun otra modalidad proporciona una infección inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus* que comprenden por lo menos una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína que se puede obtener mediante un método de la invención, o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de dicha proteína. Luego de la administración de dicha composición inmunogénica a un animal, dicha molécula de ácido nucleico se expresa por la maquinaria del animal que resulta en la expresión en por lo menos una proteína y/o parte inmunogénica, derivado y /o análogo de acuerdo con la invención. La producción y, opcionalmente, la excreción extra celular de dicha proteína y/o parte inmunogénica, derivado y/o análogo resulta en una respuesta inmunológica.

En una modalidad una proteína de la invención y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo se produce de una manera recombinante. La invención proporciona un método para producir una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus*, dicho método comprende administrar una célula u otro sistema de expresión con por lo menos un vector recombinante, dicho por lo menos un vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína que se puede obtener mediante un método de la invención y/o por lo menos una proteína seleccionada de la tabla 5 y/o tabla 6 y/o una parte inmunogénica derivado y/o análogo de dicha proteína. Se conocen en la técnica sistemas de expresión adecuados. En una modalidad se expresa una secuencia

de ácido nucleico que codifica una proteína de la invención o una parte inmunogénica de la misma. En otra modalidad se utiliza por lo menos una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos dos proteínas y/o partes inmunogénicas. También es posible utilizar dos moléculas de ácido nucleico, cada molécula de ácido nucleico que codifica a una o más proteínas y/o partes inmunogénicas de acuerdo con la invención, etc. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica (por lo menos) una proteína y una molécula de ácido nucleico que codifica (por lo menos) una parte inmunogénica son adecuadas. Por lo tanto, son posibles variaciones del numero de moléculas de ácido nucleico y el numero de proteínas y/o partes inmunogénicas codificadas por dichas moléculas de ácido nucleico.

Una secuencia de ácido nucleico de la invención se inserta por ejemplo dentro del genoma de una célula mediante recombinación homóloga. También es posible insertar una secuencia de ácido nucleico en forma aleatoria por ejemplo por electroporación. Alternativamente, o adicionalmente, dicha secuencia de ácido nucleico se coloca en un vector tal como por ejemplo un vector plásmido o un vector fago, cuyo vector es estable en un sistema de expresión seleccionado tal como un micro-organismo y/o una célula. Dicha secuencia de ácido nucleico de la invención se transcribe preferiblemente y se traduce bajo el control de una secuencia reguladora tal como por ejemplo un promotor, mejorador y/o terminador. Preferiblemente dicho promotor, mejorador y/o terminador es adecuado para uso en el sistema de expresión seleccionado. Más preferiblemente dicha secuencia reguladora se puede inducir con el fin de permitir la expresión controlada. Los promotores y terminadores adecuados para varios micro-organismos se describen en (Biseibutsugaku Kisokoza (Basic Microbiology), Vol. 8, Genetic Technology, Kyoritsu Shuppan (1990)). Por ejemplo, los vectores de plásmido adecuados, para

Escherichia mas específicamente para *Escherichia Coli* son los plásmidos de las series pBR y pUC, y promotores adecuados por ejemplo comprenden promotores lac (β-galactosidase) operón trp (operón trictofan), y promotor tac (promotor hibrido lac-trp) y promotores derivados de λ-faag PL o PR. Los terminadores preferidos comprenden trpA- o fago derivado del terminador ribosómico rrnB. Los vectores plásmidos adecuados para la producción recombinante en *Streptococcus* pHV1301 (FEMS Microbiol. Lett. 26, 239 (1985)) and pGKl (Appl. Environ. Microbiol. 50, 94 (1985)).

La invención proporciona así una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos dos proteínas *Streptococcus* que se puedan obtener mediante un método de la invención y/o seleccionar de la tabla 5 y/o tabla 6, y/o una parte inmunogénica de por lo menos una de dichas proteínas, bajo el control de una secuencia reguladora ligada secuencialmente tal como por ejemplo un promotor. Una célula anfitrión aislada que comprende una influencia de ácido nucleico que codifica por lo menos dos proteínas se puede obtener mediante un método de la invención y/o seleccionar de la tabla 5 y/o tabla 6, y/o parte inmunogénica de la misma, que también se suministra aquí. Dicha célula anfitriona comprende preferiblemente una célula anfitriona procariótica.

En una modalidad preferida una molécula de ácido nucleico de la invención se utiliza para provocar una respuesta inmunológica contra el *Streptococcus*. Esto se hace preferiblemente con un portador recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína que se puede obtener mediante un método de la invención y/o seleccionar de la tabla 5 y/o tabla 6 y/o una parte inmunogénica de dicha por lo menos una proteína, o una molécula de ácido

nucleico recombinante de la invención. Por lo tanto también se proporciona aquí dicho portador recombinante. De manera más preferible se proporciona un portador recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína seleccionada de la tabla 5 y/o tabla 6. Más preferiblemente se suministra un portador recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína seleccionada de la tabla 5 y/o 6. En una modalidad particularmente preferida dicho portador recombinante comprende un ácido nucleico que codifica por lo menos dos proteínas seleccionadas de la tabla 5 y/o 6. En una modalidad, dicho portador recombinante se le permite producir por lo menos una proteína de la invención, después de lo cual se utiliza una combinación de por lo menos una proteína recombinante y el portador en sí mismo para provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos cepas de *Streptococcus y/o* serotipos. En una modalidad se proporciona un portador recombinante muerto de la invención. Sin embargo una modalidad preferida de la invención suministra un portador recombinante de la invención vivo. En una modalidad dicho portador vivo es un portador atenuado. Un portador vivo de la invención es preferiblemente capaz de infectar un individuo humano y/o un animal no humano, después de lo cual se provoca una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus.*

Un portador recombinante de la invención comprende preferiblemente una especie *Streptococcus.* Esta forma es una respuesta inmunológica dirigida contra *Streptococcus* provocada por las proteínas y/o partes inmunogénicas derivados y/o análogos codificados por dicho portador, y por dicho portador recombinante en si mismo. Los productos de expresión génica capsulares de *Streptococcus* son altamente inmunogénicos y específicos de serotipos. Por lo tanto, la presencia de productos de expresión génica capsular dificulta la inducción de una respuesta

183

inmunológica dirigida contra varias cepas diferentes y/o serotipos de *Streptococcus.* En una modalidad, por lo tanto, si un portador recombinante de la invención comprende un *Streptococcus*, a dicho *Streptococcus* le falta por lo menos parte de un producto de expresión génico capsular. En una modalidad dicho *Streptococcus* es un *Streptococcus* no capsular

Como se describió anteriormente, la inmunización con por lo menos dos proteínas y/o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de por lo menos dos cepas de *Streptococcus* diferentes y/o serotipos proporciona una amplia protección y disminuye la oportunidad de formación de mutantes de escape. Una modalidad preferida de la invención proporciona por lo tanto un portador recombinante de la invención que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína y/o parte inmunogénica de la misma derivada de una primera cepa de *Streptococcus y/o* serotipo, y una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína y/o parte inmunogénica de la misma derivada de una segunda cepa de *Streptococcus* y/o serotipo. Dicho portador recombinante comprende preferiblemente un portador recombinante vivo.

Un portador recombinante se produce por ejemplo en una célula anfitriona adecuada. También se proporciona una célula anfitriona aislada que comprende un portador recombinante de la invención.

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

dicha composición comprende un portador recombinante de la invención y por lo tanto también se suministra aquí.

Después de la administración de una composición inmunogénica de la invención a un individuo humano y/o a un animal no humano, se provoca una respuesta inmunológica contra *Streptococcus.* Dicha respuesta inmune es preferiblemente capaz de contra restar por lo menos en parte una enfermedad relacionada con *Streptococcus.* Por lo tanto también se suministra aquí una composición inmunogénica de la invención para uso como un medicamento, así como también un uso de una composición inmunogénica de la invención para la preparación de un medicamento contra una enfermedad relacionada con *Streptococcus.*

Una composición inmunogénica de la invención también es adecuada para la producción de una vacuna. Dicha vacuna es preferiblemente capaz de suministrar por lo menos en parte protección contra una enfermedad relacionada con *Streptococcus.* Preferiblemente, dicha vacuna es capaz de proporcionar protección contra una infección de *Streptococcus*. Por lo tanto la invención proporciona el uso de una composición inmunogénica de la invención para la preparación de una vacuna.

Preferiblemente se administra una proteína, parte inmunogénica, derivado, análogo y/o portador recombinante de la invención a un individuo humano y/o no humano junto con un portador adecuado. Dicho portador facilita preferiblemente la aceptación por dicho individuo humano y/o animal de dicha proteína, parte inmunogénica, derivado, análogo y/o portador recombinante de la invención e incrementa preferiblemente el efecto inmunogénica. Un portador adecuado de la invención comprende por ejemplo un adyuvante adecuado capaz de incrementar

un efecto inmunológico de una composición inmunogénica de la invención. Muchos adyuvantes adecuados, basados en aceite y basados en agua, son conocidos por el experto en la técnica. En una modalidad dicho adyuvante comprende Diluvac Forte y/o Specol. En otra modalidad, dicho portador adecuado comprende una solución similar como por ejemplo a la solución salina por ejemplo para diluir proteínas o partes inmunogénicas, derivados y/o análogos de los mismos. Por lo tanto, la presente invención también describe una composición inmunogénica de la invención que comprende por lo menos una proteína, parte inmunogénica, derivado, análogo y/o portador recombinante de la invención y un portador adecuado.

Una composición inmunogénica de la invención es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus* en un individuo humano y/o un animal no humano y reduce por lo tanto y/o controla el número de organismos de *Streptococcus* en dicho individuo y/o animal. Por lo tanto la invención proporciona un método para reducir y/o controlar el número de organismos *Streptococcus* en un individuo humano y/o un animal no humano que comprende proporcionar a dicho individuo y/o animal no humano de una composición inmunogénica de la invención.

Una composición inmunogénica de la invención es preferiblemente capaz de contrarrestar por lo menos en parte y/o prevenir una enfermedad relacionada con *Streptococcus*. Una vez la enfermedad relacionada con *Streptococcus* ya está presente, una composición inmunogénica de la invención es preferiblemente capaz por lo menos en parte de contrarrestar dicha enfermedad. También por lo tanto se suministran aquí una composición farmacéutica que comprende una composición inmunogénica de la invención y, preferiblemente, un portador

adecuado tal como por ejemplo Diluvac Forte y/o Specol también por lo tanto se suministran aquí.

Una modalidad adicional de la invención proporciona un método para medir la inmunidad de un individuo humano y/o animal no humano contra *Streptococcus*, dicho método comprende determinar por lo menos una muestra de dicho individuo y/o animal no humano contra *Streptococcus*, dicho método comprende determinar por lo menos una muestra de dicho individuo y/o animal la presencia de anticuerpos y/o células inmunológicas dirigidas contra una proteína obtenible mediante un método de la invención y/o seleccionada de la Tabla 5 y/o 6, o una parte inmunogénica de la misma. También se proporciona aquí un equipo para diagnóstico que comprende por lo menos una proteína que se puede obtener mediante un método de la invención y/o seleccionar de la Tabla 5 y/o 6, o una parte inmunogénica de la misma, y unos medios para detectar anticuerpos de unión y/o unión de células inmunes a dicha proteína o parte inmunogénica de la misma. En una modalidad particularmente preferida dicho equipo para diagnóstico comprende por lo menos dos proteínas seleccionadas de las Tablas 5 y/o 6.

Descripción detallada

Un método de acuerdo con la invención es una modalidad preferida aplicada para identificar una proteína *Streptococcus uberis* que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*. Tal proteína *Streptococcus uberis* se utiliza preferiblemente para la preparación de una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*. Una composición inmunogénica capaz de provocar una

respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis*. Una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus uberis* comprende por lo menos una, preferiblemente por lo menos dos, proteínas aisladas y/o recombinantes obtenibles por un método de acuerdo con la presente invención, o por lo menos una parte inmunogénica derivado y/o análogo del mismo, que por lo tanto también se suministra aquí, así como también usos de los mismo para la preparación de un medicamento contra mastitis por de *Streptococcus uberis*. Adicionalmente la invención suministra una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos dos proteínas *Streptococcus uberis* que se pueden obtener mediante un método de acuerdo con la presente invención, y/o seleccionar de la Tabla 5 y/o 6. Se proporciona adicionalmente portadores recombinantes, células anfitrionas y composiciones inmunogénicas que comprenden dichos ácidos nucleicos, así como también usos de los mismos.

El *Streptococcus uberis* se asocia con la mastitis bovina. La mastitis bovina es una infección de la glándula mamaria de la vaca, originada usualmente por bacterias. La respuesta inflamatoria luego de la infección resulta en producción y calidad de leche reducida, y origina pérdidas económicas anuales importantes para la industria lechera. Se estima que el daño económico en Holanda es de aproximadamente 100 Euros por vaca al año.

Entre las especies bacterianas más comúnmente asociadas con la mastitis están varias especies del género *Streptococcus*, que incluye de *Streptococcus uberis* (no tipificable), de *Streptococcus agalactiae* (grupo B Lancefield), *Streptococcus dysgalactiae* (grupo C Lancefield), de *Streptococcus zooepidemicus*, y los grupos

D, G, L Lancefield y los estreptococos N. Algunas de éstas especies son contagiosas (por ejemplo *S. agalactiae*), aunque las oras se consideran patógenos medioambientales (por ejemplo *S. dysgalactiae* and *S. uberis*).

La mastitis que resulta de la infección con *S. uberis* es comúnmente sub-clínica, caracterizada por leche aparentemente normal con un incremento en los conteos de células somáticas debido al influjo de los leucocitos.

La mastitis varía en severidad de acuerdo con los efectos clínicos originados por la infección. Una forma leve de mastitis puede originar algún incremento en la temperatura corporal, y/o incremento en la temperatura de la ubre. En casos más severos, la mastitis por *S. uberis* también puede tomar la forma de una afección clínica aguda, con signos obvios de la enfermedad tal como coágulos o decoloración de la leche e inflamación o dureza de la glándula mamaria. Algunos casos de la enfermedad clínica pueden ser severos y puede haber pirexia. Para una revisión de las manifestaciones clínicas de la mastitis por *S. uberis*, ver Bramley (1991); y Schalm et al. (1971).

Los métodos de control antibacteriano convencionales tal como inmersión de la teta y terapia antibiótica son efectivos en el control de muchos tipos de mastitis contagiosa, pero los organismos medioambientales se encuentran típicamente en todas las granjas lecheras frecuentemente son resistentes a tales medidas. Por lo tanto estas medidas no han influenciado la incidencia de la mastitis originada por patógenos medioambientales tal como de *Streptococcus uberis* y *Escherichia Coli* que son ahora responsables de más del 95% de los casos de mastitis. De estas dos especies, *S. uberis* es el patógeno medioambiental más importante, como se muestra por encuestas realizadas en el Reino Unido (Hillerton et al., 1993), en

Nueva Zelanda (McDougall, 1998), en los Estados Unidos (Hogan et al., 1989), y en Holanda (Animal Health Service, 2000). También hay evidencia de que el *S. uberis*, luego de la infección que se establece del ambiente, puede esparcirse directamente de una vaca infectada a un animal susceptible (Neave et al., 1969, Oliver et al., 1999, Zadoks et al, 2001). Existen varias cepas de *S. uberis* que difieren en virulencia y antigenicidad.

La falla de los métodos actúales dirigidas al control de la mastitis por *S. uberis* ha conducido a la búsqueda de medidas de control alternativas tal como vacunas más efectivas. Hasta ahora se han desarrollado varios tipos de vacunas y se han probado en vacas.

La inmunización repetida de ganado lechero con bacterias completamente muertas resulta en la reducción del número de bacterias presentes en la leche luego de exposición experimental con la misma cepa (Leigh, 1999; Leigh, 2000). Las vacunas muertas sin embargo no evitan la infección ni la respuesta inflamatoria en la glándula mamaria, y no tienen efecto en la incidencia de la mastitis por *S. uberis* en el campo (Leigh, 1999). Por lo tanto, se concluye que la inmunización con bacterias muertas no es una solución al problema de la mastitis por *S. uberis.* La inmunización con *S. uberis* viva induce la protección parcial contra la exposición experimental con la misma cepa (u homóloga) (Finch et al., 1997). Se alcanza la protección en la ausencia de actividad de opsonización y sin un gran influjo de neutrófilos. Sin embargo, la vacuna no parece proteger contra otras cepas de *S. uberis.* El bajo éxito relativo con estos métodos de vacuna de células completas indica que es difícil proteger un animal contra *S. uberis* utilizando vacunas de bacterias completas convencionales.

Más recientemente, se produce una vacuna subunitaria, basada en una proteína de *S. uberis.* (Fontaine et al. 2002). La publicación de dicha vacuna subunitaria hasta ahora no ha conducido a un seguimiento, que haya llegado a la conclusión de que la oportunidad de hallar una única proteína que protegerá a un animal contra varios tipos de *S. uberis* sean vacunas subunitarias y pequeñas de ésta clase que generalmente no es la respuesta al problema del control de la mastitis por *S. uberis.*

En resumen, la mastitis originada por *S. uberis* no se evita efectivamente o se cura por la vacunación con bacterias completas, vivas o muertas o con vacunas subunitarias que comprenden una proteína.

A pesar de los resultados desalentadores descritos anteriormente de la vacunación contra la mastitis por *S. uberis*, describimos aquí que la mastitis originada por una variedad de cepas *S. uberis* se evita exitosamente y/o disminuye al utilizar una composición antigénica capaz de provocar una respuesta inmune contra *S. uberis* de acuerdo con la invención.

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

a) identificar por lo menos parte de una proteína secretada, una proteína asociada con superficie y/o una proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano;

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

c) determinar si por lo menos una proteína seleccionada en la etapa b)o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo y/o célula inmune de un animal infectado mediante una primera cepa de *Streptococcus uberis* y/o tipo, y un anticuerpo y/o célula inmune de un animal infectado por una segunda cepa de *Streptococcus uberis* y/o tipo. Preferiblemente, dicha proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano tiene por lo menos 60%, más preferiblemente por lo menos 70%, más preferiblemente por lo menos 75%, más preferiblemente por lo menos 80% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano.

La presente invención describe adicionalmente que una combinación de por lo menos dos proteínas de superficie *S. uberis* recombinantes o aisladas o una parte inmunogénica de la misma en una composición antigénica, mejora la respuesta inmunológica contra cepas *S. uberis* de manera considerable. Aunque las vacunas de células bacterianas completas, que comprenden muchas proteínas inmunogénicas bacterianas no provocan una amplia protección contra varias cepas *S. uberis*, dos o más proteínas o una parte inmunogénica de la misma en una composición inmunogénica de la invención tienen el efecto deseado de mejorar la respuesta inmune contra *S. uberis.* Describimos en la presente invención que seleccionar por lo menos dos proteínas inmunogénicas o una parte inmunogénica de ésta de un organismo *S. uberis*, y preferiblemente de por lo menos des cepas o tipos de *S. uberis* y combinar dichas por lo menos proteínas inmunogénicas o una parte inmunogénica de ésta en una composición

inmunogénica mejora la inmunidad contra diferentes cepas de *S. uberis* debido a que la respuesta inmunológica se dirige contra un amplio rango de diferentes organismos de *S. uberis*.

Para provocar una respuesta inmunológica en un sujeto o un animal, preferiblemente una parte inmunogénica de una proteína está presente a dicho sujeto o animal. En ésta invención, el término "sitio inmunogénico" se utiliza intercambiablemente aquí con el término "parte inmunogénica". Por "sitio o parte inmunogénica" significa una parte de una proteína, que es capaz de provocar una respuesta inmunológica en un sujeto. Preferiblemente dicha parte inmunogénica de una proteína comprende uno o más epítopos y provoca así una respuesta inmunológica. Una parte inmunogénica comprende por lo menos 5 aminoácidos, preferiblemente por lo menos 10-15, y más preferiblemente 25 o más aminoácidos consecutivos. Por lo tanto, la invención en otra modalidad proporciona una proteína o una parte inmunogénica de ésta que comprende por lo menos una tira de 30 aminoácidos consecutivos de una molécula proteinácea codificada por un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Un epítopo conformacional se forma generalmente por varias tiras de aminoácidos consecutivos que se plegan en posición y forman juntos un epítopo cuando la proteína se pone sobre su estructura tridimensional. La presente invención también describe el uso de epítopos conformacionales como partes inmunogénicas.

Un derivado de una proteína se define como una proteína, que tiene la misma clase de propiedades inmunogénicas en clase, pero no necesariamente n cantidad. Una persona experta en la técnica es capaz de alterar una proteína de tal manera que las propiedades inmunogénicas de dicha molécula sean esencialmente de la misma clase, pero no necesariamente en cantidad. Se puede

proporcionar un derivado de una proteína de muchas formas, por ejemplo a través de sustituciones de aminoácidos conservadores, por ejemplo mediante el reemplazo de un aminoácido en una proteína por otro aminoácido. En el mapeo de reemplazo convencional, se hacen preferiblemente cambios conservadores, como por ejemplo el reemplazo de un aminoácido que comprende una cadena lateral ácida por otro aminoácido que comprende una cadena lateral ácida, aminoácidos voluminosos por aminoácidos voluminosos, aminoácidos que comprenden una cadena lateral básica por aminoácidos que comprenden una cadena lateral básica, aminoácidos que comprenden una cadena lateral polar no cargada por aminoácidos que comprenden una cadena lateral polar no cargada, y aminoácidos que comprenden una cadena lateral no polar por aminoácidos que comprenden una cadena lateral no polar. Una persona experta en la técnica será capaz de generar compuestos análogos de una proteína. Esto se hace por ejemplo a través de detección de una colección de péptidos o mediante programas de cambio de péptidos. Para uso común inmunógeno, un péptido se sintetiza con las características apropiadas para asegurar alta probabilidad de éxito en la producción de anticuerpos. Estos incluyen en grupo carboxilo libre de terminal C si el péptido es la secuencia de terminal C actual de la proteína natural y un grupo amino terminal N libre si el péptido es una secuencia de terminal N actual de la proteína natural. Tal un análogo tiene esencialmente las misma propiedades inmunogénicas de dicha proteína en clase, pero no necesariamente en cantidad. Una proteína o péptido está sujeta a la degradación mediante un número de diferentes fuerzas, tal como por ejemplo proteólisis, desdoblamiento, valores de pH extremos, detergentes y altas concentraciones de sal. Para prolongar la vida de una proteína recombinante o péptido, dicha proteína o péptido se hace más estable para resistir la degradación, por ejemplo al sintetizar dicho péptido con una carboxamida de terminal C y/o acetilar el extremo del terminal N con el fin de

mantener las características de carga naturales. Esto se hace adicionalmente mediante mutaciones que utilizan una estrategia de mutación estabilizante para inhibir los procesos de desdoblamiento locales que hacen generalmente que la proteína sea susceptible a autolisis. Dicha estrategia de mutación estabilizante se basa en principios generalmente aceptados de estructuras de proteína y estabilidad como se describe por ejemplo en Matthews (1991), Alber (1989), Vriend and Eijsink (1993) y Fersht and Serrano (1993).

En una modalidad una composición inmunogénica de la invención comprende una composición que comprende por lo menos dos proteínas de superficie aislada o recombinante o un derivado o un análogo, y/o partes inmunogénicas de la misma, en donde la administración de la composición a un sujeto o un animal, preferiblemente una vaca, resulta en el desarrollo de una respuesta inmunológica celular y/o humoral a dichas proteínas de superficie o partes inmunogénicas de la misma.

Una respuesta inmunológica comprende el desarrollo de una respuesta inmunológica celular y/o humoral dirigida contra dicha proteína o parte inmunogénica de la misma en un sujeto o un animal, preferiblemente una vaca. Una respuesta inmunológica humoral conduce a la producción de anticuerpos en un sujeto o un animal, aunque la respuesta inmunológica celular mejora predominantemente la formación de las células inmunológicas reactivas. En general, ambas partes de la respuesta inmunológica son provocadas por la administración de una proteína inmunogénica o parte de la misma. Una respuesta inmunológica preferida contra *S. uberis* es la producción de anticuerpos. Preferiblemente, dicha respuesta inmunológica evita y/o reduce la mastitis, y/o reduce el número de organismos *S. uberis* en la ubre. La presente invención

describe métodos para seleccionar y producir proteínas y epítopos para provocar dicha respuesta de anticuerpo. Otra respuesta inmunológica preferida contra *S. uberis* es la respuesta inmunológica células. La presente invención también describe métodos para seleccionar epítopos de células T de proteínas de superficie, y para producir epítopos de células T que hacen una reactividad de células T mejorada, por ejemplo al acoplar múltiples epítopos de células T preseleccionados en una forma de cadena de glóbulos como lo describe por ejemplo Van der Burg et al (WO 97/41440).

En una modalidad de la invención, dicha composición inmunogénica es capaz de reducir la duración y/o severidad de la infección y/o incrementar la resistencia del animal a la infección por *S. uberis*.

La presente invención describe que se prefiere una respuesta inmunológica dirigida contra el exterior del *S. uberis*. Por lo tanto, la presente invención describe una composición inmunogénica o una parte inmunogénica de ésta que es capaz de provocar una respuesta inmune a antígenos que se ubican preferiblemente en o cerca de la superficie celular de *S. uberis.* Una proteína de superficie de la invención comprende proteínas que están en la naturaleza preferiblemente cerca o sobre la superficie de una bacteria *S. uberis*, y/o proteínas que están en la naturaleza preferiblemente producida y/o extracelulares excretadas por una bacteria *S. uberis.* Dichas proteínas de superficie tienen preferiblemente proteínas homólogas en otras cepas de *S. uberis.* Por lo tanto, la respuesta inmunológica provocada con proteínas inmunogénicas o partes de las mismas, derivadas de una cepa de *S. uberis*, también es efectiva contras cepas de *S. uberis.* Así la presente invención describe una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *S. uberis*, dicha composición comprende por lo

menos dos proteínas de superficie aisladas y/o recombinantes derivadas de *Streptococcus uberis,* y/o una parte inmunogénica de cualquiera o ambas de dichas proteínas.

El término "proteína recombinante" se refiere a una proteína producida por técnicas de ADN recombinantes; es decir, producidas por una célula transformada por una construcción de ácido nucleico que codifica la proteína deseada. Dicha construcción de ácido nucleico es por ejemplo una construcción de ADN recombinante con una secuencia reguladora tal como una secuencia promotora y/o una secuencia terminadora, y/o una secuencia mejoradora, que controla la secuencia de expresión.

El término "proteína aislada" se refiere a una proteína separada y discreta del organismo completo, con la que la molécula se encuentra en la naturaleza; y/o una proteína desprovista, en todo o en parte, de sustancias asociadas normalmente con ésta en la naturaleza. Dichas composiciones inmunogénicas comprenden por lo menos dos proteínas o una parte inmunogénica de ésta derivada de el mismo organismo *S. uberis* o comprende por lo menos una proteína o una parte inmunogénica de ésta de un tipo de *S. uberis* y por lo menos una proteína o una parte inmunogénica de ésta de otro tipo de *S. uberis.* La invención también describe la combinación de por lo menos 3 o 4 o más proteínas o una parte inmunogénica de éstas, de las que una o dos o más se derivan de otros tipos de *S. uberis.*

Preferiblemente, la composición inmunogénica o una parte inmunogénica de ésta de la invención comprende proteínas de por lo menos dos diferentes organismo *S. uberis*, debido a que la amplia respuesta inmunológica resultante es de protección

cruzada es decir se dirige contra diferente tipos de *S. uberis.* Por ejemplo, el uso de proteínas inmunogénicas o una parte inmunogénica de las mismas de por lo menos dos tipos de cepas *S. uberis* reduce la oportunidad de desarrollo de mutantes de escape de organismos *S. uberis.* Los mutantes de escape de organismos bacterianos generalmente se desarrollan bajo tensión ambiental, por ejemplo en la presencia de un antibiótico o en la presencia de antibióticos contra un epítopo de dicho organismo. Mediante la variación natural tal como por ejemplo originada por una frecuencia de baja mutación en la población de una organismo, algunos organismos de dicha población se inhiben más en su replicación por dichos anticuerpos, que otros, que escapan del efecto inhibidor de la presencia de dichos anticuerpos y se mantienen multiplicando, obteniendo por lo tanto un papel predominante en la nueva población. La oportunidad de desarrollar un mutante de escape para varios epítopos diferentes en un momento es más pequeña que la oportunidad de desarrollar un mutante de escape para solo un epítopo. Una composición inmunogénica y/o una parte inmunogénica de la misma provoca preferiblemente una respuesta inmunológica contra por lo menos dos proteínas originando preferiblemente una amplia protección contra la infección y reducción de los síntomas clínicos de la mastitis. Por lo tanto, la presente solicitud suministra una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis* que comprende por lo menos dos proteínas de superficie aisladas y/o recombinantes derivadas de por lo menos una cepa *Streptococcus uberis*, y/o una parte inmunogénica o análogo o derivado de cualquiera o ambas de dichas proteínas.

Las proteínas que son importantes para el metabolismo o supervivencia o multiplicación de un organismo bacteriano de conocen generalmente como proteínas esenciales de un organismo. La secuencia y función de dichas proteínas

esenciales se conserva generalmente entre diferentes tipos de *S. uberis*. En una modalidad preferida de la invención, dichas proteínas inmunogénicas son proteínas esenciales de un *S. uberis*. De ésta forma, la respuesta inmunológica se dirige contra una proteína esencial o una parte inmunogénica de la misma, formando así una defensa contra un organismo *S. uberis* homólogo, pero también una defensa de reactividad cruzada contra diferentes tipos de *S. uberis*, debido a que dicha proteína conservada o proteína esencial también está presente en la superficie de otros tipos de *S. uberis*. Por lo tanto, el uso de una proteína de superficie esencial de un organismo *S. uberis* como una proteína inmunogénica de la invención incrementa la eficacia protectora de la respuesta inmunológica contra la infección con diferentes tipos de organismos *S. uberis* y reduce la posibilidad de que dichos organismos escapen a la respuesta inmunológica.

Los antígenos capsulares de *S. uberis* son epítopos inmunogénicos generalmente buenos, debido a que los antígenos capsulares se detectan fácilmente por suero de vacas de convalecientes, (que han sufrido una mastitis *S. uberis*). Dichas propiedades inmunogénicas son capaces de mejorar la respuesta inmunológica contra epítopos inmunogénicos *S. uberis* relacionados. Por lo tanto, en otra modalidad, la composición inmunogénica comprende por lo menos un antígeno capsular en adición a las proteínas inmunogénicas, debido a que el antígeno capsular incrementa la respuesta inmunológica contra dicha composición inmunogénica.

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

composición inmunogénica de la invención, y/o una parte inmunogénica o análogo o derivado de cualquiera o ambas de dichas proteínas en donde por lo menos dos proteínas se seleccionan de la Tabla 5 y/o Tabla 6.

En una modalidad preferida de la invención, se hace una selección de las proteínas de la Tabla 5 y/o Tabla 6 y se hace una combinación de dos o más proteínas como por ejemplo la proteína no. 63 y/o una parte inmunogénica de ésta de la cepa *S. uberis* O140J, junto con la proteína no 15 o 22 y/o ambas y/o una parte inmunogénica de éstas de la cepa *S. uberis* 41-241. Tal una selección proporciona proteínas o partes inmunogénicas de éstas de dos cepas diferentes de *S. uberis*, proporcionando por lo tanto amplia protección para varias cepas de *S. uberis*.

En una modalidad preferida la selección de las proteínas de la Tabla 5 y/o Tabla 6 comprenden una proteína seleccionada del grupo que consiste de P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, y P105. Como se mencionó anteriormente, estas proteínas son reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero de animales infectados con *S. uberis*, lo que indica que éstas proteínas se expresan in vivo y son inmunogénicas en vacas, o tienen reactividad cruzada entre por lo menos dos cepas de *S. uberis* como se describe en la Tabla 5.

Las proteínas como se identifican en el Ejemplo 11, son especialmente útiles para provocar una respuesta inmunológica. Por lo tanto en aún una modalidad más preferida, la selección de proteínas de la Tabla 5 y/o 6 comprenden una proteína seleccionada del grupo que consiste de P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, y P105. Más preferiblemente, la selección de proteínas de la Tabla 5 y/o

Tabla 6 comprenden una proteína seleccionada del grupo que consiste de P15, P16, P54, P28, P63, y P105. Como se mencionó anteriormente, la última selección de proteínas se expresa por todas las cepas *S. uberis* que originan la infección respectiva del Ejemplo 11, que se expresan durante infección en el anfitrión y son altamente inmunogénicos. La numeración de las anteriores proteínas, caracterizadas por ejemplo en la Tabla 5, se refiere a las proteínas descritas en por ejemplo las Tabla 1, 2 y 3 que muestran ejemplos no limitantes de proteínas de superficie común *S. uberis.* Adicionalmente, la Figura 4 muestra ejemplos no limitantes de secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de éstas proteínas de superficie putativas seleccionadas/factores de virulencia de *S. uberis*.

Un bajo número de bacterias en la leche o en una ubre se encuentra frecuentemente bajo condiciones de campo y no necesita ser perjudicial para un animal. La mastitis se puede desarrollar cuando el número de bacterias, por ejemplo organismos *S. uberis*, se incrementa en la leche o en la ubre. Una respuesta inmunológica, provocada por proteínas o partes inmunológicas de la misma de acuerdo con la invención, es preferiblemente efectiva en inhibir por lo menos en parte el crecimiento bacteriano de organismos *Streptococcus uberis* en una ubre. La reducción de los números de los organismos *S. uberis* en el medio ambiente directo también ayuda a evitar la mastitis. La presente invención describe como evitar y/o reducir la mastitis por *S. uberis* al inmunizar las vacas, manteniendo por lo tanto el número de organismos *S. uberis* bajo. Dicho bajo nivel de organismos *S. uberis* se mantiene adicionalmente bajo al aplicar un régimen higiénico durante el ordeño por ejemplo al limpiar la ubre, los pezones, y todos los aparatos que entran en contacto con la ubre y/o las teta.

Las proteínas de superficie aisladas y/o recombinantes derivadas de *S. uberis*, como se suministra por la invención, se producen en una modalidad mediante un sistema de producción que utiliza una célula procariótica o una célula eucariótica. Ejemplos de células con un anfitrión bien desarrollado/sistemas de vectores para la producción de proteínas recombinantes son por ejemplo para las bacterias: *Escherichia, Bacillus, Pseudomonas, Serratia, Brevibacterium, Corynebacterium, Streptococcus* y *Lactobacillus*; y para las levaduras: *Saccharomyces, Kluyveromyces, Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces, Yarrowia, Trichosporon, Rhodosporidium, Hansenula, Pichia* y *Candida*; y para los hongos: *Neurospora, Aspergillus, Cephalosporium* en *Trichoderma*.

Para la producción de una proteína recombinantes de interés, el gen, que codifica dicha proteína o parte de la misma ya sea integrada en el genoma por ejemplo por recombinación homóloga o aleatoria, o dicho gen se coloca en un vector plásmido o en un vector fago, que se mantiene establemente y se expresa en el microorganismo seleccionado o células. Para la expresión de la construcción de ADN seleccionado en el microorganismo o célula, el gen se transcribe y se traslada bajo el control de un promotor y un terminador. Preferiblemente dicho promotor y terminador son adecuados para el microorganismo seleccionado. Los promotores y terminadores adecuados para varios microorganismos se describen en "Biseibutsugaku Kisokoza (Basic Microbiology), Vol. 8, Genetic Technology, Kyoritsu Shuppan (1990)", y aquellos preferidos para levaduras en "Adv. Biochem. Eng. 43, 75-102 (1990)" y en "Yeast 8, 423-488 (1992)". Por ejemplo, los vectores de plásmidos para *Escherichia*, más específicamente para *Escherichia Coli* son los plásmidos de las series pBR y pUC, y promotores adecuados comprenden el promotor lac (β-galactosidasa), operón trp (operón triptofaan), y promotor tac (promotor hibrido lac-trp) y promotores derivados de λ-faag PL o PR.

Los terminadores preferidos comprenden trpA- o fago derivado de terminador ribosómico rrnB. Los vectores plásmidos adecuados para producción recombinante en *Streptococcus* comprende por ejemplo pHV1301 (FEMS Microbiol. Lett. 26, 239 (1985)) y pGK1 (Appl. Environ. Microbiol. 50, 94 (1985)). Los vectores de plásmido adecuados para producción recombinante en *Lactobacillus* comprenden por ejemplo aquellos descritos para *Streptococcus*, como por ejemplo pAMβ1 (J. Bacterid. 137, 614 (1979)). Los vectores de plásmidos adecuados para producción recombinante en *Saccharomyces*, preferiblemente *Saccharomyces cereuisiae*, comprenden por ejemplo vectores de las series YRp, YEp, YCp en YIp. Un vector de integración (EP5327456) construido al aplicar recombinación homóloga de ADN ribosómico con multicopia en el cromosoma es adecuado para la inserción de multicopia y para el control génico estable. Los vectores de plásmido adecuados para producción recombinante en *Kluyveromyces*, preferiblemente *Kluyueromyces lactis*, comprenden por ejemplo las series de plásmidos de 2 µm derivado de *Saccharomyces cereuisiae*, plásmidos de las series pKD1 (J. Bacteriol. 145, 382-390 (1981)), y plásmidos derivados de pGK11 involucrados en actividad mortífera, los plásmidos de las series KARS con gen de replicación autónoma de *Kluyveromyces* y un vector de integración (EP 537456). Los vectores de plásmidos adecuados para producción recombinante en *Pichia* comprende por ejemplo el sistema de vector anfitrión desarrollado por *Pichia pastoris* utilizando un gen, que está involucrado en la replicación autónoma en *Pichia* (Mol. Cell. Biol. 5, 3376 (1985). Los vectores de plásmido adecuados para producción recombinante en *Candida* comprende por ejemplo el sistema de vector de anfitrión desarrollados en *Candida maltosa, Candida albicans* y *Candida tropicalis*. (Agri. Biol. Chem. 51, 51, 1587 (1987). Los vectores de plásmido adecuados para producción recombinante en *Aspergillus*, comprenden por ejemplo un vector construido mediante integración

del gen en el plásmido o cromosoma y el promotor para proteasa extracelular o amilasa (Trends in Biotechnology 7, 283-287 (1989)). Los vectores de plásmidos adecuados para producción recombinante en *Trichoderma* comprenden por ejemplo el sistema de vector anfitrión desarrollado en *Trichoderma reesei*, y el promotor para células extracelulares, que es adecuado para construcción del vector (Biotechnology 7, 596- 603 (1989)).

Preferiblemente, dicho sistema de producción está provisto con una construcción de ácido nucleico, preferiblemente una construcción de ADN, que codifica una proteína de la Tabla 5 y/o Tabla 6 o una parte inmunogénica de la misma. En otra modalidad, dicho sistema de producción está provisto con una construcción de ADN que codifica dos o tres o cuatro o aún más proteínas de de la Tabla 5 y/o Tabla 6, o una parte inmunogénica de la misma.

En aún otra modalidad, dicho sistema de producción está provisto con por lo menos dos construcciones de ADN, cada codificación para por lo menos una proteína de la Tabla 5 y/o Tabla 6, o una parte inmunogénica de la misma.

En una modalidad preferida, dicha proteína de la Tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste de P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, y P105. Aún más preferido dicha proteína de la Tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste de P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, y P 105. Más preferido, dicha proteína de la Tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste de P15, P16, P54, P28, P63, y P105.

En una modalidad mas preferida, dicha construcción de ácido nucleico codifica una proteína de fusión, que comprende epítopos inmunogénicos derivados de más

de una proteína de *S. uberis*. Más preferiblemente, dicha proteína de fusión comprende epítopos derivados de proteínas derivadas de más de una cepa *S. uberis*. En otra modalidad de la invención dicha construcción de ácido nucleico codifica epítopos, que se han modificado para mejorar la respuesta inmunológica humoral y/o celular. Por lo tanto, la presente solicitud suministra un método para producir una composición inmunogénica que comprende por lo menos dos proteínas de *S. uberis* capaces de provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis*, dicho método comprende proporcionar una célula con un vector recombinante, dicho vector comprende un ácido nucleico que codifica por lo menos dos proteínas como se lista en la Tabla 5 y/o Tabla 6, y/o una parte inmunogénica o análogo o derivado de cualquier o ambas de dichas proteínas. Para la producción recombinante de una proteína a partir de un ácido nucleico, dicho ácido nucleico se coloca preferiblemente abajo del control de una secuencia reguladora inducible capaz de mejorar la expresión de dicha proteína, resultando preferiblemente en un producto de mayor proteína. Preferiblemente la acumulación de dicha proteína recombinante o parte inmunogénica de la misma es citoplásmica, por ejemplo en aquellos casos en donde la proteína recombinante producida se cosecha a partir de las células, o la proteína se excreta, por ejemplo cuando la proteína se cosecha a partir del fluido de cultivo. Por lo tanto, la construcción recombinante que codifica dicha proteína inmunogénica está provista con secuencias reguladoras correctas y/o un promotor ligado funcionalmente para acumulación intracelular o extracelular.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una molécula recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico codifica por lo menos dos proteínas como se lista en la tabla 5 y/o tabla 6, y/o una parte inmunogénica o análogo o derivado de cualquiera o ambas de dichas proteínas bajo el control de un promotor

ligado funcionalmente. En una modalidad preferida dicha proteína como se lista en la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste de P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, y P105. Aun mas preferido dicha proteína como se lista en la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste de P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, y P105.

La solicitud también proporciona un portador recombinante vivo que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención o una molécula de ADN recombinante de la invención. En una modalidad preferida, el portador es una primera cepa de *S. uberis* y el ácido nucleico recombinante codifica los epítopos inmunogénicas de otra cepa *S. uberis.* Por lo tanto, la presente invención proporciona un portador recombinante vivo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más proteínas como se lista en la tabla 5 y/o tabla 6, y/o una parte inmunogénica o análogo o derivado de cualquiera o ambas de dichas proteínas bajo el control de un promotor ligado funcionalmente. Por supuesto, dicho portador recombinante vivo también es inmunogénica cuando muere. Por lo tanto, la presente invención también describe un portador recombinante muerto.

La solicitud proporciona adicionalmente una célula anfitriona aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más proteínas como lista la tabla 5 y/o tabla 6, y/o una parte inmunogénica o análogo o derivado de cualquiera o ambas de dichas proteínas bajo el control de un promotor ligado funcionalmente. Una célula anfitriona aislada por ejemplo comprende una célula bacteriana tal como por ejemplo: *Escherichia, Bacillus, Pseudomonas, Serratia, Breuibacterium, Corynebacterium, Streptococcus uberis, Streptococcus suis, Lactobacillus, o un hongo tal como por ejemplo: Saccharomyces, EJuyueromyces,*

206

Schizosaccharomyces, Zygosaccharomyces, Yarrowia, Trichosporon, Rhodosporidium, Hansenula, Pichia, Candida, o un hongo tal como por ejemplo: *Neurospora, Aspergillus, Cephalosporium,* y/o *Trichoderma.*

Con la célula anfitriona aislada mencionada anteriormente que comprende una molécula recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más proteínas como se lista de la tabla 5 y/o tabla 6, y/o una parte inmunogénica o análogo o derivado o cualquiera o ambas de dichas proteínas bajo el control de un promotor ligado funcionalmente la presente invención describe a una persona experta cómo producir una molécula proteinácea recombinante. Debido a la variación entre diferentes cepas *S. uberis*, las proteínas y péptidos de varias cepas pueden mostrar una ligera variación en la secuencia de aminoácidos y aun tener la misma función. Por lo tanto, una molécula proteinácea derivada de una cepa *S. uberis* tiene identidad de secuencia con una molécula proteinácea funcionalmente idéntica de otra cepa de *S. uberis.* La "identidad de secuencias" se refiere al porcentaje de identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos después de alinear las dos secuencias e introducir espacios, si es necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Se conocen bien en la técnica de programas de computador y métodos para la alineación. Un programa de computador que se puede utilizar o adaptar para propósitos de determinar si una secuencia candidato cae dentro de esta definición es "Align 2", de Genentech, Inc., que se registra con la documentación de usuario en la oficina de derechos de autor, de los Estados Unidos, Washington, D. C. 20559, en Diciembre 10, 1991. Dos secuencias de aminoácidos, tiene un alto grado de "identidad de secuencias" uno con el otro cuando las secuencias presentan por lo menos aproximadamente 80%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 90%, y más preferiblemente

por lo menos 95% de identidad de secuencia de las moléculas después de alineación. Por lo tanto, la presente solicitud describe una molécula proteinácea aislada y/o recombinante que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con una proteína codificada con un ácido nucleico de acuerdo con la invención. En una modalidad preferida, la invención describe una molécula proteinácea aislada y/o recombinante que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con una molécula proteinácea codificada por un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Para inducir o provocar una respuesta inmunológica en un animal contra una proteína o una parte inmunogénica de la invención, dicho animal está provisto de una proteína y/o una parte inmunogénica que comprende por lo menos un sitio inmunogénica. Una parte sitio inmunogénica de una proteína se forma por uno o más epítopos y así es capaz de provocar una respuesta inmunológica. Un sitio inmunogénica comprende preferiblemente por lo menos cinco aminoácidos, mas preferiblemente por lo menos 10-15 y mas preferiblemente 25 o más aminoácidos consecutivos. La invención en otra modalidad preferida proporciona una proteína o una parte inmunogénica que comprende por lo menos una tira de 25 aminoácidos consecutivos de una molécula de proteínas codificadas por un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Preferiblemente dicha tira de por lo menos 25 aminoácidos consecutivos comprende un sitio inmunogénica. Una molécula de aminoácido recombinante en una modalidad preferida codifica por lo menos una proteína o proteína de fusión que codifica para por lo menos dos proteínas o partes inmunogénicas de la misma. En una modalidad preferida dicha proteína de fusión comprende partes inmunogénicas de por lo menos dos cepas de *S. uberis.* Por lo tanto, la invención describe un ácido nucleico que modifica una molécula proteinácea de acuerdo con la invención.

La expresión de dicho ácido nucleico en una célula anfitriona proporciona una proteína inmunogénica de la invención. Dicha proteína inmunogénica se incorpora preferiblemente en una composición inmunogénica de la invención. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis*, dicha composición comprende una molécula proteinácea recombinante y/o aislada de acuerdo con la invención.

Dicha proteína recombinante de la invención se produce por una célula anfitriona. Como una célula anfitriona, se utilizan para la producción las especies bacterianas tal como por ejemplo *E. Coli* y/o levaduras u hongos o células eucarióticas.

Una composición inmunogénica que incorpora una proteína aislada y recombinante y/o una célula que expone dicha proteína es capaz de provocar una respuesta inmune contra *Streptococcus uberis*, cuando se administra a un animal preferiblemente una vaca. Preferiblemente, dicha célula comprende un ácido nucleico de la invención bajo una secuencia reguladora adecuada que expresa dicha proteína en la superficie. Tal una célula se llama célula portadora. Dicha célula portadora se incorpora preferiblemente en la composición inmunogénica de la invención. Preferiblemente dicha célula que lleva dicha proteína inmunogénica es un portador recombinante vivo, pero en otra modalidad dicha célula portadora es capaz de provocar una respuesta inmune cuando la célula se sacrifica mediante por ejemplo tratamiento con formalina. Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmune contra *Streptococcus uberis*, dicha composición comprende un portador recombinante vivo o muerto de la invención. Debido a la causa de la

mastitis en las vacas por *Streptococcus uberis*, en una modalidad preferida de la invención, dicho portador recombinante vivo o muerto es una especie *Streptococcus*. En una modalidad de la invención dicha célula anfitriona es una especie de *Streptococcus*. A molécula proteinácea se presenta luego preferiblemente en el contexto de otras proteínas estreptocócicas, que mejora la producción de una respuesta inmunológica.

Adicionalmente, la inmunogenicidad se puede mejorar mediante la sobre expresión de las proteínas recombinantes sobre la superficie de la célula anfitriona, preferiblemente una célula estreptocócica. Adicionalmente, el uso de diferentes cepas de células anfitrionas estreptocócicas mejora la inmunogenicidad de las proteínas inmunogénicas o partes de las mismas. Por lo tanto, la presente invención también proporciona una composición inmunogénica de acuerdo con la invención, en donde dicha célula anfitriona es de la especie *Streptococcus*. Existen varias especies de estreptococos que también son adecuados como una célula anfitriona, por ejemplo *S. suis* o *S. agalactiae* o *S. dysgalactiae*.

Debido a las diferencias entre varias especies de estreptococos, y debido a que algunas proteínas, que ocurren en la naturaleza en *Streptococcus uberis*, son capaces de ayudar a provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis*, en una modalidad preferida, se utiliza *Streptococcus uberis* atenuado como un portador recombinante en una composición inmunogénica de la invención. Preferiblemente, dicho organismo *S. uberis* expresa proteínas de *S. uberis*, describiendo por lo tanto una vacuna de diferenciación, debido a que el suero de un animal vacunado con dicha vacuna se puede discernir del suero de un animal infectado con una infección de caldo, al detectar anticuerpos contra proteínas de ambas cepas. En otra modalidad dicho organismo *S. uberis* se reemplaza como

una célula anfitriona o como un portador vivo o muerto por una especie *S. suis* o *Staphylococcus* o un *E. Coli*, ya sea vivo o muerto.

La administración de una proteína inmunogénica de la invención o una parte de la misma, o la administración de un ácido nucleico que codifica dicha proteína de la invención provoca una respuesta inmunológica. Dicho ácido nucleico, cuando se administra a una vaca, se expresa en las células de dicha vaca y es reconocida por el sistema inmunológico e dicha vaca. El ácido nucleico actúa por lo tanto como una composición inmunogénica, como por ejemplo una vacuna de ADN contra la mastitis. Por lo tanto la presente invención proporciona una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis*, dicha composición comprende un ácido nucleico de la invención.

Debido a que la composición inmunogénica de la invención provoca una respuesta inmunológica en un animal preferiblemente una vaca, la proteína de la invención reduce la enfermedad relacionada con mastitis y mejora la salud de dichas vacas, produciendo por lo tanto vacas con mucha más resistencia a otras infecciones (secundarias). Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición inmunogénica de acuerdo con la invención para uso de un medicamento.

Preferiblemente, la composición inmunogénica de la invención se utiliza para fabricar un medicamento contra mastitis por *Streptococcus uberis* que reduce la enfermedad especifica como resultado de la mastitis *Streptococcus uberis*. Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de una composición inmunogénica de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento contra la mastitis por *Streptococcus uberis*.

Una composición inmunogénica de la invención también se utiliza para producir y formular una vacuna contra la mastitis, una vacuna evita que los animales o humanos contraigan una enfermedad. Preferiblemente, la composición inmunogénica de la presente invención es capaz de evitar la mastitis. Por lo tanto, la presente invención describe una modalidad preferida del uso de una composición inmunogénica de acuerdo con la invención para la preparación de una vacuna.

En otra modalidad, la composición inmunogénica de la invención se usa preferiblemente para reducir y/o controlar el número de organismos *S. uberis* en la leche y/o en la ubre de la vaca. El proceso de ordeño en una granja lechera comprende un peligro potencial de transferencia de organismos *S. uberis* de una vaca enferma a otra vaca. La reducción en el numero de organismos *S. uberis* es por lo tanto más adecuada para suprimir la dispersión de la infección desde el pezón de la ubre al pezón de la ubre de animal a animal.

Para administración de una composición inmunogénica de la invención a un sujeto, la mezcla de las proteínas o partes inmunogénicas de la misma o células anfitrionas con un portador adecuado facilita la aceptación por un sujeto de la composición inmunogénica e incrementa el efecto inmunogénica de la composición. Un portador adecuado de la invención comprende por ejemplo un adyuvante adecuado para incrementar el efecto inmunológico de dicha composición inmunogénica. Muchos adyuvantes adecuados, basados en aceite y basados en agua son conocidos por las personas expertas en la técnica, por ejemplo adyuvante Diluvacforte® o adyuvante Specol®. En una modalidad dicho portador adecuado comprende por ejemplo una solución similar por ejemplo a la

solución salina para diluir bacteria o proteínas o partes inmunogénicas de las mismas. Por lo tanto la presente invención describe una composición farmacéutica que comprende una composición inmunogénica de la invención y un portador adecuado.

En un animal, preferiblemente una vaca, que se inmuniza con una composición inmunogénica de la invención, produce anticuerpos que se dirigen contra *S. uberis.* La presencia y el nivel de dichos anticuerpos son indicadores de inmunidad después de inmunización con una composición inmunogénica o una vacuna de la invención. Dichos anticuerpos no se dirigen preferiblemente contra epítopos que están presentes como tipo natural de cepas *S. uberis* en el caldo. Para discernir un animal vacunado de un animal que tiene una infección tipo silvestre, la inmunidad de dicho animal vacunado es en una modalidad medido preferiblemente al medir los anticuerpos dirigidos contra dicha composición inmunogénica de la invención. El antisuero de dicha vaca vacunado también se prueba para la presencia de anticuerpos contra antígenos *S. uberis*, que no están presentes en la composición inmunogénica. La detección de anticuerpos contra antígenos *S. uberis* no está presente en la composición inmunogénica o vacuna de la invención que es una indicación de una infección tipo silvestre. Por lo tanto, la presente invención describe un método para medir la inmunidad de un animal contra *S. uberis*, dicho método comprende determinar en por lo menos una muestra de dicho animal la presencia de anticuerpos dirigidos contra una proteína seleccionada de la tabla 5 y/o tabla 6 o una parte inmunogénica de la misma. Es una modalidad preferida dicha proteína seleccionada de la tabla 5 y/o tabla 6 se selecciona del grupo que consiste de P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P101 y P105. Aun mas preferido dicha proteína de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste de P15, P16,

213

P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, y P105. Más preferido dicha proteína seleccionada de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste de P15, P16, P54, P28, P63, y P105.

Para la detección de anticuerpos, que se unen a la composición inmunogénica de la invención, un equipo diagnostico es adecuado el cual comprende por lo menos una de las proteínas de la tabla 5 y/o tabla 6 o una parte inmunogénica de la misma. La unión del anticuerpo hecha proteína o parte inmunogénica de la misma se detecta por medio de por ejemplo detección de anticuerpo inmunofluorescente o detección de anticuerpo ligado a enzima o cualquier otro método de detección de anticuerpo unidos a dicha proteína o parte inmunogénica de la misma.

Una modalidad preferida, dicho por lo menos una de las proteínas de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste de P15, P16, P17, P19, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P64, P68, P75, P81, P93, P100, y P105. Aun mas preferido dicha por lo menos una de las proteínas de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste de P15, P16, P20, P27, P54, P28, P63, P68, P93, y P105. Más preferido dicha por lo menos una de las proteínas de la tabla 5 y/o 6 se selecciona del grupo que consiste de P15, P16, P54, P28, P63, y P105.

Por lo tanto, la presente invención describe un equipo diagnostico que comprende por lo menos una proteína seleccionada de la tabla 5 y/o tabla 6, o parte inmunogénica de la misma y medios para detectar anticuerpos que se unen a dicha proteína o parte inmunogénica de la misma. Tal equipo de diagnostico es por lo menos una prueba ELISA o cualquier otra prueba adecuada detección de suero. Preferiblemente dicho equipo de prueba es aceptado para tratar grandes números de sueros.

En otra modalidad, el ácido nucleico de la invención se utiliza para la detección de animales infectados con cepas de *S. uberis* tipo silvestre en una población de animales vacunados con una composición inmunogénica o una vacuna de la invención. Esta detección se logra por ejemplo al utilizar un PCR.

La presente solicitud de patente describe que las proteínas inmunogénicas exitosas de la invención son moléculas proteináceas y/o proteínas accesibles a los anticuerpos en la superficie bacteriana y común para un número de cepas de *S. uberis.* Como un ejemplo, las proteínas de superficie se identifican a partir de las secuencias de genomas de las cepas 41-241 y O140J al seleccionar genes que contienen una o más secuencias encontradas comúnmente en proteínas de superficie de bacterias gran-positiva, como por ejemplo un motivo de estorasa LPXTG requerido para el anclaje de la proteína a la pared celular, o un motivo de unión a lípido requerido para lipoproteínas, o una secuencia de señal o una región de transmembrana que predice una ubicación de superficie de la proteína codificada.

La presente solicitud describe la presencia de proteínas seleccionadas en las cepas de *S. uberis* como se examina al probar ADN cromosómico de un número de cepas de *S. uberis* con productos PCR obtenidos de los genes como se selecciono anteriormente.

La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, pero sirven únicamente para clarificar la invención. Muchas modalidades alternativas se pueden llevar a cabo, que están dentro del alcance de la presente invención.

Legenda De Las Figuras

Figura 1. Análisis FACS en cepas *S. uberis* intactas. Se incuban cepas *S. uberis* 41-241 (A) y O140J (B) con inmuno suero de ratones (barras oscuras) o con el correspondiente suero pre inmune (barras claras). Los anticuerpos ligados se detectan utilizando anticuerpos secundarios conjugados con FITC. Los datos se expresan como la media de la fluorescencia asociada con células bacterianas. Una fluorescencia de > 10 (2 x fondo) se considera que es positiva. Los números de suero utilizados se refieren a los números de genes las proteínas como se indica en las tablas 1 a 4.

Figura 2. Patrones de proteoma 2D teñidos con azul brillante coomasi.

Los lisatos de cepas *S. uberis* 41-241 (A) y O140J (B) que crecen exponencialmente se sondean con suero bovino obtenido de vacas después de infección experimental con la cepa O140J. Las proteínas en círculos se identifican por ser proteínas inmunogénicas. Las propiedades de las proteínas identificadas como analizadas por digestión tríptico en gel - espectrometría de masa, MALDI-TOF se muestran el tabla 6.

Figura 3. Infección de vacas con cepa *S. uberis* O140J o cepa 41-421.

3A. Se infectan vacas 6716 y 6717 a través del conducto de la leche con la cepa *S. uberis* O140J.

Las vacas 6720 y 6721 se infectan a través del conducto de la leche con *S. uberis* 41-421. Note que la vaca 6720 se infecta con 5000 cfu de *S. uberis* y la 6721se infecta con 500 cfu de *S. uberis*.

SSC significa conteo de células somáticas en la leche. BO significa investigación bacteriana y se presenta como el número de organismos como unidades formadoras de colonia (cfu) aisladas de la leche.

RV cuarto anterior derecho LA significa cuarto posterior izquierdo.

3B. síntomas clínicos y resultados citológicos y bacterianos de vacas 6718 y 6719 después de infección con la cepa *S. uberis* O140J.

3C. síntomas clínicos y resultados citológicos bacterianos de vacas 6722 y 6723 después de infección con cepa *S. uberis* 41 – 241.

Figura 4. Secuencias de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos de proteínas *S. uberis* de la tabla 5.

Ejemplos

Ejemplo 1

Selección de antígenos de superficie común.

Análisis de secuencia de ADN. La secuencia de ADN de la cepa *S. uberis* 41-241 se ha determinado con un cubrimiento de 2 x. se ensamblan datos de

secuenciamiento para obtener 572 secuencias contiguas que contienen 1815 ORF. En el centro Sanger se ha secuenciado la cepa *S. uberis* O140J, (Hill, 1988). Los datos de secuencia disponibles en el sitio de Sanger en abril 2002 se ensamblan también para obtener 61 clones solapados que contienen 1938 ORF.

Selección de antígenos de superficie común. Los antígenos de vacuna exitosos son proteínas accesibles a los anticuerpos en la superficie bacteriana y común para un número de cepas de *S. uberis.* Las proteínas de superficie se identifican a partir de las secuencias de genoma de las cepas 41-241 y O140J al seleccionar genes que contienen una o más secuencias que forman un motivo de firma (ver M&M) encontrado comúnmente en proteínas de superficie de bacterias gram-positivas. Entre todos los ORF analizados, 17 ORF contienen un motivo de sortasa LPXTG (tabla 1) requerido para anclaje de la proteína a la pared celular. Cuatro (P12, P23, P24 y P25) de estas 17 proteínas se encuentran exclusivamente en la cepa 41-241.

31 ORF contiene un motivo de adhesión de lípido requerido para lipoproteínas (tabla 2).

Todas estas proteínas se encuentran en la cepa O140J así como también en la cepa 41-241. Más aun, se seleccionan 87 ORF que contienen una secuencia de señal o una región de transmembrana que predice una ubicación de superficie de la proteína codificada (tabla 3).

Estas proteínas se encuentran en la cepa O140J así como también en la cepa 41-241.

Ejemplo 2

Distribución de genes seleccionados entre varios aislados clínicos y sub clínicos de *S. uberis*.

Para examinar la presencia de genes seleccionados entre varias cepas *S. uberis*, se desarrollan experimentos de hibridación de punto en el que el ADN cromosómico de un número considerable de cepas *S. uberis* clínicas se sondean con productos PCR obtenidos de 99 de los genes seleccionados. Los datos (tabla 4) muestran que la mayoría de genes seleccionados hibridan con la mayoría de cepas *S. uberis*, lo que sugiere que la mayoría de genes seleccionados están comúnmente presentes entre las varias cepas *S. uberis.* En contraste, 4 de los 99 genes probados hibridan solo con un número limitado de cepas. Todos estos genes están presentes en la cepa 41-241 y codifican proteínas que tienen un motivo de sortasa LPXTG requerido para anclaje de la proteína a la pared celular.

Ejemplo 3

Inmunogenicidad de las proteínas de superficie seleccionadas.

Para evaluar un papel de las proteínas como candidatos de vacuna las proteínas codificadas por 115 de los genes seleccionados se clonan y expresan en *E. Coli.* Con etiquetas de polihistidina. Los productos de 106 de estos genes se clonan exitosamente y se expresan en *E. Coli.* Posteriormente, el suero obtenido de vacas infectadas con *S. uberis* y de conejos inmunizados con formalina muerta o células *S. uberis* sonicadas se prueban para la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra las proteínas expresadas por análisis Western blot. Los resultados (tabla 5) muestran que 19 de las proteínas expresadas se reconocen por los anticuerpos presentes en el suero de animales infectados con

S. uberis, lo que indica que estas proteínas se expresan in vivo y son inmunogénicas en vacas. Más aun, 30 de las proteínas expresadas se reconocen por anticuerpos presentes en suero de conejos inmunizados con formalina muerta o células *S. uberis* sonicadas.

Doce de las proteínas expresadas se reconocen por suero obtenido de vacas infectadas con *S. uberis* así como también de conejos inmunizados con formalina muerta o células *S. uberis* sonicadas. Estos datos indican que la mayoría de las proteínas son antigénicas.

La tabla 5 también muestra que algunas proteínas se reconocen por antisuero inducido después de infección experimental con ambas cepas 41-241 y O140J. Sin embargo, otras proteínas reaccionan positivas y exclusivamente con otros sueros obtenidos después de infección con la cepa O140J o con suero obtenido después de infección con la cepa 41-241. Estas diferencias indican probablemente entre las dos cepas en la expresión de proteína in vivo o en accesibilidad de las proteínas en el sistema inmunológico.

Ejemplo 4.

Purificación de las proteínas seleccionadas

Para evaluar adicionalmente un papel de las proteínas como candidatos de vacuna, se purifican todas las 36 proteínas reconocidas ya sea por suero de vacas infectadas y/o por suero de conejos inmunizados. Adicionalmente, se purifican cuatro proteínas que contienen un motivo de sortasa pero que no reaccionan con ambos sueros. 31 de las 40 proteínas recombinantes seleccionadas se sobre expresa exitosamente en forma soluble y se puede purificar bajo condiciones

naturales, mientras que 5 proteínas se expresan como cuerpos de inclusión insolubles. Estas proteínas se purifican utilizando condiciones de desnaturalización y las proteínas se repliegan después de purificación. Para 4 proteínas es incapaz de purificar cantidades suficientes para inmunización. Todas las 36 proteínas purificadas se utilizan posteriormente para inmunizar ratones. Como se muestra en el análisis Western blot ninguna de las proteínas es reactiva con el suero obtenido de ratones antes de inmunización. En contraste sin embargo, las proteínas reaccionan fuertemente con suero inmune obtenido de ratones (tabla 5), lo que indica que las proteínas son altamente inmunogénicas en ratones. La especificidad de los anticuerpos inducido se confirma mediante inmuno transferencia contra lisatos (o sobrenadantes de protoplasto) de células *S. uberis.* Los resultados muestran que la mayoría de anticuerpos reducidos reaccionan específicamente con una proteína *S. uberis* de la masa molecular esperada indicando claramente que estas proteínas representan antígenos (superficie) que son capaces de inducir una respuesta inmunológica en ratones.

Ejemplo 5

Características funcionales de los anticuerpos inducidos

Se utiliza suero de ratones en un análisis FACS para estudiar la unión de los anticuerpos a células *S. uberis* completamente encapsuladas (que crecen en Todd-Hewitt). Como se muestra en la figura 1 ninguno de los sueros obtenidos de ratones antes de inmunización es capaz de ligar células *S. uberis* completas. En contraste, sin embargo, ocho de las proteínas inmunológicas (suero inducido contra proteínas P11, P15, P17, P20, P25, P26, P27, P63) se ligan fuertemente a células bacterianas completas, mientras que dos del suero (dirigida contra las células P17, P18) muestran una unión débil a células bacterianas completas. Esto

221

indica claramente que las proteínas reconocidas por este suero se expresan bajo condiciones utilizadas para crecimiento de células bacterianas *S. uberis* y son accesibles para ligar anticuerpos. En la adición, la figura 1 muestra claramente que la expresión y/o accesibilidad de superficie de las proteínas difiere entre las dos cepas utilizadas la expresión y/o accesibilidad de superficie se conservan en tres de las proteínas (P17, P19 y P20). En contraste, P11 y P63 se detectan exclusivamente al utilizar la cepa O140J mientras que P15, P18, P25 y P26 se detecten exclusivamente al utilizar la cepa 41-241. P27 es de superficie expuesta sobre las cepas 41-241 y O140J, pero solo se reconoce débilmente por el antisuero en la cepa 41-241.

Tomados juntos, los datos muestran claramente que 10 de los antígenos tomados se expresan sobre la superficie de la bacteria que crece invitro y están disponibles para unión de anticuerpos en células encapsuladas intactas. Tres de estas proteínas se conservan entre las dos cepas utilizadas.

Ejemplo 6

Método de proteoma serológico. Como un método alternativo para la identificación de candidatos de vacuna de *S. uberis*, se aplica análisis de proteoma serológico.

Proteínas de *S. uberis* que crecen en caldo de cultivo TH se separan por electroforesis de gel 2D y se sondean con anticuerpos presentes en suero de animales infectados con *S. uberis.* Se identifica un número de proteínas *S. uberis* altamente inmunogénicas (datos no mostrados). Se parean exitosamente tres manchas con proteínas presentes en un gel 2D teñido con azul brillante

Coomassie (figura 2) de estas proteínas se analizan productos de digestión trípticos mediante Q-TOF y las huellas de masas de péptidos se comparan con las huellas de masa de péptido en silico de todas las proteínas predichas del análisis de la secuencia de genoma de las cepas 41-241 y O140J. Adicionalmente, dos péptidos trípticos principales seleccionados de cada huella se utilizan para MS en tándem. La secuencia de aminoácidos resultante de los péptidos se compara posteriormente con las secuencias predichas de las secuencias de genomas *S. uberis.* Todas las tres proteínas pueden ser pareadas exitosamente utilizando este procedimiento. Las propiedades de las proteínas identificadas se listan en la tabla 6. Uno de estos candidatos de vacuna también se identifica utilizando el método genómico (P63). Esto destaca la importancia de la proteína como un candidato de vacuna.

Ejemplo 7

ELISA sobre sobrenadante de cultivo con suero inmunológico de ratón.

Se reconoce fuertemente P93 en P105 en sobrenadantes de cultivo de ambas cepas indicando que estas proteínas se secretan por las bacterias.

Ejemplo 8

Análisis FACS que utiliza células *S. uberis* que crecen en trigo para imitar condiciones in vivo.

Se sigue el procedimiento del ejemplo 5 para probar unión de anticuerpos a células *S. uberis* que se hacen crecer en un medio que semeja leche.

Ejemplo 9

Conservación de antígenos entre diversas cepas de células *S. uberis*.

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

Ejemplo 10

Vacunación y exposición en ganado.

Infección experimental en animales no vacunados. La virulencia de las cepas *S. uberis* y O140J y 41-241 se determina después de infección experimental. Una ubre se divide en cuatro partes llamadas generalmente cuartos. Cada cuarto comprende células que secretan leche, conductos para la leche, una cisterna para la leche y un pezón. En este experimento, cada cuarto se infecta individualmente en la cisterna para la leche a través del conducto para la leche en el pezón. Seis de ocho cuartos se inoculan con la cepa O140J y llegan a ser infectados exitosamente (figura 3, tabla 7). Los cultivos puros de *S. uberis* y O140J se aíslan de la leche obtenida de estos cuartos e incrementa los niveles de conteo de células somáticas (SCC) que se detectan. En dos cuartos (dos vacas diferentes; vaca 6717 y 6719; figuras 3A y 3B) sin infección se pueden detectar después de exposición. Ambos cuartos permanecen bacteriológicamente negativo durante el curso del experimento. En uno de los dos cuartos se observa un ligero crecimiento en el SCC. En contraste, en todos los ocho cuartos expuestos con infección de la cepa 41-241 se establecen (figuras 3A y 3B; tabla 7). Cuatro de estos cuartos (vacas 6721 y 6723) se inocula con una dosis de 5×10^2 cfu de cepa 41-241, mientras que los otros dos cuartos se inoculan con una dosis de 5×10^3 cfu (vacas

6720 y 6722). Se observan efectos más severos después de la inoculación con mayores dosis la temperatura corporal de la vacas se incrementa mas significativamente y se observan síntomas clínicos más severos de la enfermedad (coágulos en leche y consistencia firme de la ubre) (tabla 7; figuras 3A y 3C). Sin embargo, también se inducen síntomas clínicos de mastitis utilizando la cepa 41-241 en una dosis de 5 x 10^2 cfu. Se han observado previamente datos para la cepa O140J (Hill, 1988).

Comparado con la cepa 41-241 los síntomas clínicos de la mastitis obtenidos con la cepa O140J (dosis de inoculación de 5 x 10^2 cfu y estudiado durante 16 días) parecen más severos (figura 3B y 3C). Tres de los cuatro cuartos llegan a ser exitosamente infectados con la cepa O140J y todos los tres muestran síntomas clínicos de mastitis durante por lo menos 16 días después de la infección. Dos de estos cuartos permanecen bacteriológicamente positivos durante 16 días después de la infección (figura 3B) y en un cuarto se detecta un nivel incrementado de SCC durante 35 días (datos no mostrados). Todos los cuatro cuartos infectados con la cepa 41-241 muestran síntomas de mastitis durante 10-13 días durante después de inoculación, pero son negativos para síntomas clínicos de el día 13 hacia adelante (figura 3C). Dos de estos cuartos (vacas 6723) permanece bacteriológicamente positivo durante el curso del experimento (16 días), lo que indica la persistencia de *S. uberis* en la glándula mamaria (figura 3C). El examen histológico del material de la ubre se recolecta de 3-5 días que corresponde generalmente a observaciones clínicas. Ambas vacas infectadas con la cepa 41-241 y una vaca infectada con la cepa O140J presentan una mastitis moderada a severa a lo largo de la glándula completa con acumulación intra-alveolar multifocal de granulocitos polimorfo nucleares, interrupción nuclear de la capa epitelial en los alveolos e infiltración intersticial moderada de las células mononucleares (datos no

mostrados). La segunda vaca se infecta con la cepa O140J y tiene una mastitis catarral multifocal leve.

Tomados juntos, estos datos muestran que ambas cepas O140j y 41-241 son patogénicas para las vacas.

Inmunización de vacas lecheras

Se elevan los anticuerpos policronales contra las proteínas *S. uberis* en las vacas. Las vacas se inmunizan a través de varios programas de inmunización, utilizando inoculación subcutánea, y/o inoculación intramuscular y/o intramamaria.

La composición inmunogénica se formula con un disolvente similar por ejemplo a solución salina amortiguada con fosfato y un adyuvante por ejemplo adyuvante agua en aceite o un adyuvante sin aceite.

Después de inmunización, se recolecta una muestra de sangre y suero y se prueba para anticuerpos contra *S. uberis*.

Infección experimental de animales vacunados.

Se exponen vacas vacunadas y no vacunadas infectadas con 500 cfu de cepa de *S. uberis* O140J. Cada cuarto de ubre se infecta individualmente a través del conducto de leche en el pezón.

Después de exposición, las vacas vacunadas con la composición inmunogénica de la invención muestran menos síntomas clínicos de mastitis, menos alteraciones

en la leche, menores niveles de SCC, periodos de mastitis crónica cortos, menos fiebre. La clasificación clínica y la evidencia histológica de la ubre muestran claramente que la inmunización de acuerdo con la presente invención es efectiva contra la mastitis originada por *S. uberis*.

Ejemplo 11

Reactividad de los antígenos con suero de convaleciente. La capacidad de un número seleccionado de proteínas (P15, P16, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P68, P75, P93 y P105) para inducir anticuerpos de convaleciente se prueban por análisis Western blot utilizando suero de caldo obtenido de catorce vacas que se han recuperado por una reciente infección de *S. uberis.* 6 de los 12 antígenos seleccionados (P15, P16, P54, P28, P63, P105) se reconocen por todos los 14 sueros de convaleciente utilizados. Estos datos indican que estos antígenos se expresan mediante todas las cepas *S. uberis* que originan las respectivas infecciones, que estos antígenos expresan durante la infección en el anfitrión y que estos antígenos son altamente inmunogénicas. Se reconocen cinco de los antígenos (P 68, P27, P20, P93 y P22) mediante 8, 9, 10, 11 o 12 de los sueros de convaleciente respectivamente. Se pueden detectar con uno de los antígenos sin reacción con cualquiera del suero convaleciente (P75).

Ejemplo 12

Conservación de antígenos entre diversas cepas de *S. uberis.* Para indicar la adecuabilidad de los antígenos para conferir protección contra varias cepas de *S. uberis* se determina la conservación y expresión de los doce antígenos seleccionados (P15, P16, P20, P22, P27, P54, P28, P63, P68, P75, P93 y P105)

entre una recolección de una cepa de caldo aislado dad recientemente (35 cepas). La expresión de antígenos se demuestra mediante detección Western blot con suero inmunológico de ratón contra los antígenos purificados. 5 de los 12 antígenos (P15, P16, P28, P75, y P105) se expresan en > 97% de las cepas probadas: dos de los antígenos se expresan (P27, P63) se expresan en > 94% de las cepas y cuatro de los antígenos (P20, P22, P54, P93) se expresan en 81-92% de las cepas. Los datos muestran claramente que la expresión de la mayoría de los antígenos se conserva altamente entre las varias cepas de *S. uberis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones de crecimiento y cepas bacterianas

Se aísla una cepa de *S. uberis* 41-241 en 1998 a partir de una granja lechera comercial en Holanda en la que se observa un brote de mastitis por *S. uberis* (Hill, 1988). La cepa 41-241 muestra el tipo de huella RAPD y B también encontrada predominantemente en la manada particular durante el brote (Zadoks et al., 2003). La cepa se aísla de una vaca infectada *S. uberis* durante por lo menos dos meses. El inicio de la infección es sub clínica y es seguida por múltiples aradas clínicas. Las cepas *S. uberis* O140J y EF20 fueron administradas amablemente por el doctor J Leigh, Institute For Animal Health, Compton, Inglaterra. Otras cepas *S. uberis* y S. para uberis aisladas de casos clínicos de mastitis en varias granjas lecheras holandesas fueron suministradas amablemente por el Dr. D. Mevius, CIDC, Lelystad, Holanda; por los Drs. O. Sampimon, Animal Health Service, Deventer, Holanda, o por Dierenartsen Praktijk, Diessen, Holanda. Todas las otras especies estreptocócicas son de la colección del laboratorio ASG, Lelystad, Holanda. Las cepas estreptocócicas se hacen crecer en caldo de cultivo Todd-

228

Hewitt (código CM189, Oxoid), y se colocan en platos sobre base de sangre agar Columbia (código CM331, Oxoid) que contiene 6% (v/v) de sangre de caballo 0.1% de aesculina (p/v) a menos que se indique lo contrario. Se hacen crecer cepas de cultivo *E. Coli* en caldo de cultivo Luria (18) y se colocan en placas en caldo de cultivo Luria 1.5% de agar (p/v). Si se requiere se agrega 50 µg/ml de kanamicina.

Preparación del trigo. Se obtiene leche en volumen de una granja lechera sin infección por *S. uberis* en su historia (Waiboerhoeve, Lelystad, Holanda). La leche se centrifuga durante 30 minutos a 12800 x g y se remueve la grasa. Posteriormente, se agrega 40 µg/ml remina (Lactoferm, Brouwland, Belgica) y la leche se incuba durante 2hr a 37°C con mezcla regular. La leche coagulada se revuelve mediante ante tamizado y el sobrenadante resultante se centrifuga durante 30 minutos a 12800 x g. el sobrenadante depurado se esteriliza mediante filtración sobre un filtro de 0.2 um sartobran p (Sartonus, Goettingen, Alemania).

Muestras de leche y suero. Se obtiene muestras de suero y leche de casos de mastitis por *S. uberis* de varias granjas lecheras de Holanda (Drs. O. Sampimon, Animal Health Service, Deventer, Holanda). Ninguno de los animales ha sido tratado con antibióticos antes que se recolecten las muestras.

Adicionalmente, se recolecta leche y suero de vacas en varios puntos de tiempo después de infección experimental con las cepas *S. uberis* o 140J y 41-241.

Antisuero de conejo. Anticuerpos policlonales dirigidos contra células de *S. uberis* completas muertas con formalina así como también contra células *S. uberis* sonicadas se incrementan en conejos. Los conejos se inmunizan simultáneamente

utilizando 2-4 x 109 células muertas en adyuvante agua en aceite. Se repiten las inoculaciones 2,3 y 4 semanas después. Después de 6 semanas, se sacrifican los conejos y se recolecta el suero.

Para preparar los antígenos, se hacen crecer cepas de *S. uberis* durante 16h en caldo de cultivo Todd-Hewitt. Los cultivos se diluyen 10 veces en 1L caldo de cultivo Todd-Hewitt precalentado y se hacen crecer células hasta que alcancen una densidad óptica de (600nm) 0.5. Los cultivos se centrifugan durante 15 min a 10.000 xg, y se disuelven los glóbulos en 100 ml de PBS (136.89 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na2HPO4, 2.79 mM KH2PO4 pH 7.2). Posteriormente, la densidad óptica (600nm) se ajusta a 1.0 con PBS. Para preparar células de formalina fija porciones de 10ml de estas células se centrifugan durante 20 min a 10000 xg y los glóbulos se re suspenden en 2.5ml de PBS. A esta suspensión se agrega 250 micro L de 3% de formalina y se mantiene durante 16h a temperatura ambiente. La suspensión se revisa para ausencia de bacterias vivas al colocar en platos agar Columbia para remover las células de formalina se lava 2 veces con PBS. Para preparar células sonicadas se centrifugan pociones de 10 ml de las células durante 20 min a 10000 xg y los glóbulos se re suspenden en 250 micro L de PBS. Las células se sonican durante 15 min utilizando un sonificador de punta en 100 % de salida, 50% del ciclo de trabajo. Después de sonicacion, las células se diluyen 10 veces en PBS. Se mezclan ambos antígenos 1:1 con cepecol para producir emulsiones de agua en aceite.

Secuenciamiento genómico. Se aísla ADN genómico de la cepa *S. uberis* 41-241como se describe Sambrook et al. (1989). Se comparte ADN y se utiliza para crear una colección de plásmido. Los clones aleatorios se secuencian utilizando química de tinte-terminador y se analiza con un analizador ABI PRISM 3700 DNA

(Applied Biosystems, Warrington, GB). Los datos de secuenciamiento se ensamblan para obtener 572 secuencias contiguas. Un conjunto inicial de cuadros de lectura abierto (ORF) se identifican con el software GLIMMER y GENEMARK. Las hélices de transmembrana y las ubicaciones sub celulares en los genes se predicen con un programa de computador TMHMM disponible en www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM. Para investigación se utiliza un ORF para la presencia de péptidos de señal el programa Signalp (Nielsen et al., 1999). Se hacen predicciones alternativas de péptido señal utilizando el programa PSORT disponible en http://psort.nibb.ac.jp y un programa llamado GCG-SPScan disponible en http://www.biology.wustl.edu /gcg/spscan.html. se encuentra que las lipoproteínas al utilizar el programa GCG- Findpatterns con las siguientes expresiones:PS00013:

~(D,E,RJK)6(L,I,V,MJF,W,S,T,A,G)2(L,I,V,M,F;Y)S,T!A,G,C,Q)(A,G,S)C;g-lpp:<(M,V)X{0,13}(R,K)~(D,E,R,K,Q){6,20}(L,I,V,M!F,E,S,T,A,G)(L,V,I,A,M)(I,V,M,S,T,A,F,G)(A,G) C y g-lpp_rvh: (M)V,L)X{0,13}(R,K)~(D,E,R,K,Q){6,20}(L,IiV,M,F,E,S,T,A,G)(L,V,I,A,M)α)V,M,S,T,A,F,G)(A,G)C. Se identifican proteínas con dominios de anclaje de pared celular utilizando InterPro accesión IPR001899. Se utiliza el programa BLAST para buscar secuencias de proteínas con identidades de secuencia para las secuencias de aminoácidos inducidas.

Spot blotting, Southern blotting e hibridación. El ADN se aislé como describe Sambrook et al. (1989). Para el Spot blot un micro gel de ADN cromosómico se coloca sobre membranas Gene-Screen Plus. Las membranas se incuban en 0.4 M NaOH-I M NaCl a temperatura ambiente durante 10 min para desnaturalizar el ADN durante 10 min en NaCl, 0.06 M citrato de sodio (pH 7.0) para neutralización. Para los fragmentos de ADN Southern blotting se separan en 0.8% de geles de

231

agarosa y se transfieren a membranas Gene-Screen Plus (NEN) como se describe en Sambrook et al. (1989). Las ondas de ADN se etiquetan con [(α-32P] dCTP (3000 Ci mmol 1; Amersham¨) mediante el uso de un equipo etiquetado cebado aleatorio (Boehringer). El ADN en los blots se hibrida a 65°C en un amortiguador que tiene 0.5M de fosfato sodio, 1 mM EDTA, y 7% de dodecyl de fosfato de sodio pH 7.2, con las ondas de ADN apropiadas como re recomienda por el proveedor de las membranas Gene Screen Plus después de hibridación, las membranas se lavan dos veces con una solución de 40 mM fosfato de sodio, pH7.2, 1 mM EDTA, 5% SDS durante 30 min por 65°C y dos veces con una solución de fosfato de sodio 40 mM, pH 7.2, 1 mM EDTA, 1% SDS durante 30 min a 65°C. Las señales se detectan sobre un formador de imagen fosfor (Storm; Molecular Dynamics).

Clonación y expresión de proteínas seleccionadas. Se amplifican ORF seleccionados por PCR con cebadores de oligonucleótidos específicos para clonación dentro del pET200/D-TOPO (Invitrogen) las proteínas se clonan sin secuencias de señal putativas o regiones de transmembrana predichas. Las construcciones se transforman en *Escherichia Coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen) para expresión de proteínas recombinantes.

Para reacción PCR polimerasa de ADN Pfx Platinum (25 µl) (Invitrogen) se utiliza como lo describe el proveedor. Se lleva a cabo la amplificación de ADN en un ciclizador térmico Perkin Elmer 9700 y el programa consiste de una incubación durante 5 min a 94°C, 35 ciclos de 15 seg a 94°C, 30 seg at 57°C y 2 min a 68°C, y 5 min a 68°C.

Inmunodetección de los antígenos expresados. Se separan proteínas mediante electro foresis de gel de poliecrilamida SDS utilizando sistema de células mini

XCELL SureLock (Invitrogen). Las proteínas en el gen se visualizan utilizando teñido naranja SYPRO (Molecular Probes, Sunnyvale, Calif.) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Se detectan señales sobre un formador de imagen fosfor (Storm; Molecular Dynamics).

Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa mediante procedimientos estándar (19). Las membranas se bloquen en Blotto: solución salina Tris amortiguada (TBS) (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl). Que contiene 4% de leche descremada, 5% de suero de becerro fetal y 0.05% Tween 20, a temperatura ambiente (TA) durante l6 h. para detectar antígenos recombinantes, se incuban las membranas con un anticuerpo monoclonal contra la etiqueta HIS 6 x (Clontech, Palo Alto, CA.). Los anticuerpos ligados se detectan y visualizan utilizando anticuerpo anti ratón conjugado de fosfatasa alcalina y nitro-azul-tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-Indolil-fosfato como se describe por Sambrook et al. (1989).

La inmunogenicidad de los antígenos expresados se prueba al utilizar muestras de suero obtenidas de vacas clínicamente o sub clínicamente infectadas con *S. uberis* o utilizando antisuero anti-S. Uberis de conejo. Se detectan anticuerpos ligados con inmunoglobulinas de conejo-anti-vaca o cabra-anti-conejo conjugadas con fosfata alcalina (Jackson Immunoresearch) y se visualizan utilizando nitro-azul-tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-Indolil-fosfato como se describe por Sambrook et al. (1989).

Purificación de proteína. Las proteínas se purifican por afinidad a partir de glóbulos de células solubilizadas utilizando cromatografía de columna de ácido Ni-nitrilotriacetico (Ni2+-NTA) como se describe por el fabricante (Qiagen). En

resumen, las células se hacen crecer exponencialmente; 1 mM IPTG se agrega y a las células se les permite crecer unos 4 hr a 37°C. Posteriormente, las células se cosechan y se lisan. Los sobrenadantes depurados se cargan en columnas de agarosa Ni2+-NTA. Las columnas se lavan y se eluyen las proteínas. Se utilizan diferentes amortiguadores para purificación natural y por naturalización. Las proteínas purificadas bajo condiciones de desnaturalización se re naturalizan por diálisis utilizando un gradiente de urea 6M-0M en 286,89 mmnacl, 2.68mmkcl, mM Na2HPO4, 2.79 mM KH2PO4 pH 7.2. Las proteínas purificadas se concentran adicionalmente utilizando filtros Amicon Ultra-4 5000 MWCO (Millipore).

Concentración de proteína. La concentración de proteína de la muestra se determina después de electroforesis de gel de poliacrilamida SDS. Las proteínas en el gel se visualizan utilizando teñido naranja cipro (Molecular Probes, Sunnyvale, Calif.) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las señales se detectan sobre un formador de imágenes fosfor (Storm; Molecular Dynamics). Se utiliza una concentración de albumina de suero bovino como un estándar, para calcular las cantidades de proteína presentes en el gel. El programa Molecular Dynamics se utilize para los cálculos.

Inmunogenicidad de proteínas purificadas. Se inmunizan ratones OF1 subcutáneamente utilizando 20 µg de proteínas purificadas en adyuvante incompleto de Freund. Se repiten las inoculaciones tres semanas después utilizando 20 µg de proteínas purificadas en adyuvante incompleto de Freund. Tres semanas después se sacrifican los ratones de la segunda inoculación y se recolecta el suero.

Análisis FACS. Se hacen crecer células de *S. uberis* en caldo de cultivo Todd-Hewitt hasta que alcanza un OD_{600} de 0.5. Las células se recolectan por centrifugación, se lavan una vez en amortiguador FACS (PBS- 13, pH7,2 [137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 8.1 mM Na2HPO4, 2.8 mM KH2PO4] - 0,5%BSA) y la densidad celular se ajusta a aproximadamente OD_{600} 1.0 en amortiguador FACS. Las células se recolectan (250 µl) mediante centrifugación y se resuspenden en 50 µl de amortiguador FACS que contiene antisuero de ratón (en una dilución 1: 50). La muestra se incube durante 45 minutos en hielo. Para remover los anticuerpos no ligados se lavan las células dos veces con 250 µl de amortiguador FACS. Posteriormente se incuban las células con 50 µl de amortiguador FACS que contiene anticuerpo secundario de conejo-antiratón etiquetado (FITC) de isotiocianato fluoresceína (dilución 1:100; DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca) durante 30 minutos en hielo. Las células se lavan dos veces con 250 µl de amortiguador FACS, se resuspenden en 100 µl de amortiguador FACS y ambos la unión del anticuerpo se detecta mediante clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS Calibur, Benton Dickinson, Franklin Lakes, EEUU).

ELISA de célula completa. Se recolectan células de *S. uberis* que crecen exponencialmente mediante centrifugación, se resuspenden en amortiguador de recubrimiento pH 9,6 (0,05M $NaHCO_3$, 0,05M Na_2CO_3) y la densidad celular se ajusta a OD_{600} 1.0. Se cubren placas de 96 pozos de alta unión con 100 µl de ésta suspensión por pozo durante 16 hr a 4° C. Los pozos se lavan 4 veces con amortiguador ELISA (5% Tween-80, 0,02% Na-azida), se agrega suero (diluido 1:20 en PBS-13 que contiene 0,05% Tween-80, 2% NaCl, y 5% de suero de becerro fetal y las placas se incuban durante 1 hr a 37° C. Para remover anticuerpo no ligados, se lavan los pozos cuatro veces con amortiguador ELISA. Posteriormente, se agrega el anticuerpo secundario (100 µl de peroxidasa de

235

rábano conjugada con conejo-anti-ratón (DAKO) diluido 1:250 en PBS-13 que contiene 0,05% Tween-80, 2% NaCl, y 5% de suero de becerro fetal) y las placas se incuban durante 1 hr a 37° C. Los pozos se lavan de nuevo cuatro veces con amortiguador ELISA y se detectan los anticuerpos ligados a temperatura ambiente utilizando 100 µl de tetrametilbenzidina (TMB) (CeDi-Diagnostics, Lelystad, Holanda). Las reacciones se detienen después de 15 min mediante la adición de 100 µl de 0,5M H_2SO_4 por pozo. La absorbancia se lee utilizando un lector ELISA (Thermo Labsystems, Franklin, USA) a 450 nm.

Preparación de muestra para electroforesis de gel bidimensional. Se hacen crecer cepas de *S. uberis* durante 16 h en 100 ml de caldo de cultivo Todd-Hewitt. Los cultivos se diluyen 20 veces en 1 l de caldo de cultivo Todd-Hewitt precalentado y las células se hacen crecer hasta que se alcanza la densidad óptica (600 nm) 0.5. Los cultivos se centrifugan durante 20 min a 10,000 x g, y los glóbulos se lavan una vez con un volumen igual de 250 mM de sacarosa/25 mM Tris, pH 8.0 y una vez con un volumen igual de superQ. Los glóbulos resultantes se disuelven en 5 ml de superQ. Se sonican porciones de 1.5-ml de éstas suspensiones durante 15 min utilizando un sonificador de punta (sonificador Branson 250, 50% de intervalo, amplitud 3). Posteriormente, las suspensiones se tratan con ADNsa I y $MgCl_2$ (Concentraciones finales de 6.5 µg/ml y 10 mM, respectivamente) durante 10 min a 37° C. Los inhibidores de proteasa pepstatina A, leupeptina, pefabloc y aprotinina se agregan a las concentraciones finales de 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 25 µg/ml y 1 µg/ml, respectivamente. Se agrega urea, ditiotreitol y Triton-X100 a una concentración final de 9M, 70mM y 2%, respectivamente. Las muestra se centrifugan durante 30 min a 10,000 x g, los sobrenadantes se recolectan y se centrifugan durante 30min adicional a 100,000 x g. Los sobrenadantes se recolectan y la concentración de proteína en las

muestras se determina utilizando el Ensayo de Proteína RC DC (BioRad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Electroforesis de gel bidimensional. Muestras que contienen 50 - 100 µg de proteína se solubilizan en 450 µl de amortiguador de muestra (urea 8M, 2% CHAPS, 0.5% de amortiguador IPG 3-10, 70 mM de ditiotreitol y una traza de bromo-fenol-azul). Las proteínas se separan en la primer dimensión mediante enfocamiento isoeléctrico utilizando Immobiline 18 cm DryStrips (3-10 NL Amershan Pharmacia Biotech) sobre un IPGphor (Amershan Pharmacia Biotech) después de rehidratación de las tiras de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Inmediatamente después de estar enfocadas, las tiras se equilibran posteriormente durante 15 min en amortiguador de equilibrio (6M urea, 30% glicerol, 2% SDS, 50 mM Tris-HCL-pH 8.8, traza de bromo-fenol-azul) que contiene 10 mg/ml de ditiotreitol y durante 15 min en amortiguador de equilibrio que contiene 25 mg/ml de yodoacetamida. Las proteínas se separan en la segunda dimensión mediante electroforesis de gel de SDS-poliacrilamida en 12.5% de geles Ettan DALT pre-moldeados (Amershan Pharmacia Biotech) en un sistema de doce Ettan DALT (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Teñido. Las proteínas en los geles se tiñen con plata utilizando el Equipo de Teñido de Plata PlusOne™ (Amershan Pharmacia Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante o con azul Brillante Coomassie como lo describe Sambrook et al. (1989) con tiempos de incubación prolongados debido al respaldo plástico de los geles.

237

Digestión de proteínas de geles 2D. Manchas de proteína identificadas en los geles teñidos Coomassie se extraen manualmente. Se congelan piezas de gel en 0.1% de ácido acético a -80° C hasta uso. Las proteínas en los geles se digieren con tripsina como se describe por Li et al. (2003).

Espectrometría de Masa de manchas de proteínas digeridas tripticamente de geles 2D. Se utiliza un espectrómetro de masa Micromass Q-TOF para analizar las masas de las manchas de proteínas digeridas trípticamente como se describe por Li et al. (2004).

Experimentos de infección experimental

Animales. Se utilizan para infección vacas Holstein-Friesian clínicamente saludables, 2-4 semanas en su primera lactación. Las vacas se ordeñan dos veces al día a las 7.00 a.m. y 4.00 p.m. Todas las vacas tienen conteos de células somáticas (SCC) por debajo de 2.0 x 105 células/ml, que son negativas para patógenos de mastitis basados en evaluación microbiológica repetida de leche durante por los últimos 14 días antes de la infección y no tienen historia de mastitis.

Preparación de inoculo e inoculación. Se utilizan cepas de *S. uberis* O140J y 41-241 como inoculo. Colonias sencillas, que crecen en placas agar Columbia que contienen 6% de sangre de caballo (v/v) y 0.1% de aesculina (p/v), se transfieren en 90 ml de caldo de cultivo Todd-Hewitt (Oxoid) y se cultivan durante la noche a 37° C. Los cultivos se diluyen durante la noche 1 a 10 en el mismo medio y se hacen crecer bacterias a una concentración de aproximadamente 3 x 10^8 cfu/ml

(fase de crecimiento logarítmica). Luego se recolectan las células mediante centrifugación y se resuspenden y diluyen en PBS.

Dos cuartos de cada vaca se inoculan intransisternalmente con 5 x 102 (ya sea de la cepa O140J o la cepa 41-241) o 5 x 103 (cepa 41-241) cfu por 5 ml de PBS. Se inoculan cuartos de control con 5 ml de PBS. Se hacen inyecciones justo después del ordeño de la tarde utilizando cánulas de pezón desechables. Antes de la inoculación se limpian los pezones con alcohol. Se masajean los inóculos hacia arriba entro de las cisternas de la glándula.

Un grupo de cuatro vacas se expone con 5 x 10^2 cfu de la cepa O140J. Otro grupo de cuatro vacas se expone con la cepa 41-241. Dos de estas vacas se exponen con 5 x 10^2 cfu y dos vacas con 5 x 10^3 cfu. Se utilizan vacas en dos experimentos consecutivos, uno se termina después de 45 a 80 horas y el segundo después de 16 días.

Clasificación clínica y muestreo. Se recolectan muestras de leche asépticamente de los cuatro cuartos en cada ordeño. Las muestras se examinan bacteriológicamente en placas agar con sangre que contienen 6% de sangre de caballo (v/v) y 0.1% de aesculina (p/v) y el SCC se determina utilizando procedimientos estándar (International Dairy Federation, 1981). Adicionalmente se almacenan muestras de leche a -20° C hasta análisis para respuestas de anticuerpo. En cada ordeño se determina la temperatura del cuerpo de las vacas y la producción de leche y las vacas se monitorean para tomas de mastitis (consistencia de la ubre y coágulos en la leche). Una vez se recolectan muestras de sangre semanal para análisis de respuestas de anticuerpo en el suero.

Patología. Para exámenes histológicos del tejido de la glándula mamaria de cada cuarto se muestrean de diferentes sitios de tres secciones transversales horizontales, es decir en la base de la glándula, a mitad de camino entre la base y la cisterna y en la cisterna de la glándula. Las muestras de tejido se fijan en 4% de formalina amortiguada y se embeben en parafina. Para exámenes histológicos se cortan secciones de tejido y se tiñen con tinte de hematoxilina/eosina.

240

REFERENCIAS

Alber, T. 1989. Mutational effects on protein stability. Annu. Rev. Biochem. 58, 765-798.

Adv. Biochem. Eng. 43, 75-102 (1990) Agri. Biol. Chem. 51, 51, 1587 (1987)

Appl. Environ. Microbiol. 50, 94 (1985)

Biotechnology 7, 596-603 (1989)

Bramley 1991 *Mastitis: physiology or pathology*, p. 3-9. in Burvenich, C, G. **Vandeputte-van Messom, and A.W. Hill** (ed.), *New insights into the pathogenesis of mastitis*, Rijksuniversiteit Gent, Belgium

Biseibutsugaku Kisokoza (Basic Microbiology), 1990, Vol. 8, Genetic Technology, Kyoritsu Shuppan

De Greeff et al (2002), Infect Immun. 70: 1319-1325

FEMS Microbiol. Lett. 26, 239 (1985)

Fersht, A.R. and L. Serrano, 1993. principles of protein stability derived from protein engineering experiments. Curr. Opinion Struct. Biol., 3, 75-83

Finch, J.M., A. Winter, A.W. Walton and J.A. Leigh. 1997. Further studies on the efficacy of a live vaccine against mastitis caused by *Streptococcus uberis*. Vaccine 15: 1138-43.

Fontaine, M. C, J. Perez-Casal, X.M. Song, J. Shelford, P.J. Willson, A.A. Potter. 2002. Immunisation of dairy cattle with recombinant *Streptococcus uberis* GapC or a chimeric CAMP antigen confers protection against heterologous bacterial challenge. Vaccine 20: 2278-2286.

Grandi, G. 2001. Antimicrobial vaccine design using genomics and proteomics. Trends in Microbiol. 19: 181-188.

Hill, A. W. 1988. Pathogenicity of two strains of *Streptococcus uberis* infused into lactating and non-lactating bovine mammary glands. vaca Vet Sci. 45: 400- 404.

Hillerton J.E., M.F. Shearn, R.M. Teverson, S. Langridge, and J.M. Booth 1993. Effect of pre-milking teat dipping on clinical mastitis on dairy farms in England. J. of Dairy Research 60: 31-41.

Hogan, J.S., KX. Smith, K.H. Hoblet, D.A. Todhunter, P.S. Schoenberger, W.D. Hueston, D.E. Pritchard, G.L. Bowman, L.E. Heider, B.L. Brockett et al. 1989. Bacterial counts in bedding materials used on nine commercial dairies. J. Dairy Sci 72: 250-258.

J. Bacteriol. 137, 614 (1979)

J. Bacteriol. 145, 382-390 (1981)

Leigh, J.A. 1999. *Streptococcus uberis*: a permanent barrier to the control of bovine mastitis?. Vet. J. 157: 225-238.

Leigh, J. A. 2000. Vaccines against bovine mastitis due to *Streptococcus uberis* current status and future prospects. Adv. Exp. Med. Biol. 480: 307-311.

Li, K.W., M.P. Hornshaw, R.C. van der Schors, R. Watson, S. Tate, B. Casetta, CR. Jimenez, Y. Gouwenberg, E.D. Gundelfinger, K-H. Smalla, and A.B. Smit 2004 Proteomics Analysis of Rat Brain Postsynaptic Density. J. Biol. Chem. Vol.279, 987-1002.

Matthews, B.W. 1991. Mutational analysis of protein stability. Curr. Opinion Struct. Biol., 1, 17-21.

McDougall, 1998. Efficacy of two antibiotic treatments in curing clinical and sub-clinical mastitis in lactating dairy cows. New Zealand Vet. J. 46, 226-232.

MoL Cell. Biol. 5, 3376 (1985)

Neave F.K., F.H. Dodd, R.G. Kingwell and D.R. Westgarth. 1969. Control of mastitis in the dairy herd by hygiene and management. J Dairy Sci.52: 696- 707.

Nielsen, H., S. Brunak, and G. von Heijne. 1999. Machine learning approaches to the prediction of signal peptides and other protein sorting signals. Protein Engineering 12: 3-9.

Oliver S.P., M.J. Lewis, B.E. Gillespie, S.J. Ivey, L.H. Coleman, R.A. Almeida, W. Fang, and K. Lamar. 1999. Evaluation of a postmilking teat disinfectant containing a phenolic combination for the prevention of mastitis in lactating dairy cows. J. of Food Protection 62: 1354-1357.

Paton, J.C. and P. Giammarinaro. 2001. Genome-based analysis of pneumococcal virulence factors: the quest for novel vaccine antigens and drug targets. Trends in Microbiol. 9: 515-518.

Pizza M, V. Scarlato, V. Masignani, M.M. Giuliani, B. Arico, M. Comanducci, G.T. Jennings, L. Baldi, E. Bartolini, B. Capecchi, CL. Galeotti, E. Luzzi, R. Manetti, E. Marchetti, M. Mora, S. Nuti, G. Ratti, L. Santini, S. Savino, M. Scarselli, E. Storni, P. Zuo, M. Broeker, E. Hundt, B. Knapp, E. Blair, T. Mason, H. Tettelin, D.W. Hood, A.C. Jeffries, N.J. Saunders, D.M. Granoff, J.C. Venter, E.R. Moxon, G. Grandi and R. Rappuoli. 2000. Identification of vaccine candidates against serotype B Meningococcus by whole-genome sequencing. Science 287: 1816-1820.

Rappuoli, R. 2000. Reverse vaccinology. Current Opinion in Microbiol. 3: 445-450.

Wizemann T.M., J.H. Heinrichs, J.E. Adamou, A.L. Erwin, C. Kunsch, G.H. Choi, S. C. Barash, CA. Rosen, H.R. Masure, E. Tuomanen, A. Gayle, Y.A. Brewah, W. Walsh, P. Barren, R. Lathigra, M. Hanson, S. Langermann, S. Johnson and S. Koenig. 2001. Use of whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. Infect. Immun. 69: 1593-1598.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Schalm et al. (1971) The mastitis complex-A brief summary, p. 1-3. In Bovine

Mastitis. Lea & Febiger, Philadelphia.

Trends in Biotechnology 7, 283-287 (1989)

Van der Burg, S.H., W.M. Kast, R.E.M. Toes, R. Offringa, C J.M. Melief, Methods for selecting and producing T cell peptide epitopes and vaccines incorporating said selected epitopes. International Patent Application WO 97/41440.

Vriend, G. and V.G.H. Eijsink, 1993. Prediction and analysis of structure, stability and unfolding of bacillus neutral proteases. J. Computer-Aided Mol. Design 7, 367-396.

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

Yeast 8, 423-488 (1992).

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

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

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

TABLA 1. Proteínas de superficie de *S. Uberis* que contienen un motivo de sortasa PLxTGE

Proteína	contig. nr.	aa (nr.)	Homología de base de datos (no. de acceso)	% de Identidad	Señal de clasificación predicha
P11	231c11	1270	*S. mutans* Exo-beta-D-fructosidasa (U78296)	54	LPMTSD SNNNLEELGILVILTTLGAFLGRVILKKEK
P12	S00737	317	Proteína hipotética *S. Agalacticae* desconocida (Q8CM32)	60	LPNTGE SSIAPFTAIGAIILSVLGLLGFKKRRTY
P13	129h4	484	Proteína similar a colágeno S. pyogenes (AY069936)	45	LPSTGD KANPFFTAAALAVMASAGMVAVSRKRKED
P14	K00518	565	Proteína similar a colágeno S. pyogenes (AF336814)	44	LPSTGD KANPFFTAAALAVMASAGMVAVSRKRKED
P15	130g06	693	*S. pyogenes* 5'-nucleotidasA(NC_004070)	46	LPTTSS QEDTAILLSLLGASSLAMAVALKKKENN
P16	223b05	268	Sin homología	--	LPSTGE DYQAYLVAAAMALIASSGMVAYGSYRKKKQK
P17	52g05	1074	*Bacillus halodurans* desconocida (NC_002570)	34	LPALAD GSHKDDSKLFWVTGLLVASGGLFAALKRREED
P18	240d11	499	Homologo de proteína de unión fibrinógeno S. aureus (AJ005646)	26	LPMAGE RGSRLFTFIGLSLILGIAGYLLKHKKVKS
P19	32a09	278	Precursor de beta-N-acetyl-hexosamidasa *S. Pneumoniae* (NC_003098)	32	LPPTGS QESGIFSLFSALISTALGLFLLKSNKND
P20	122b06	506	Proteína de unión lactoferrina *S. uberis* (AAQ83577.1)	42	LPSTGD KPVNPLLVASGLSLMIGAGAFVYAGKRKKG
P22	130g06	1483	Precursor PrtA de proteína serina S. pneumoniae (AF127143)	25	LPETRD SSSMANWSLAFFLSAVICFFKGRRKRLNKL

P23	S03520	456	Sin acierto	--	LPTTGD KADGSIVQMVIGALMVSFVGFSALKDRKKEK
P24	S00737	238	Proteína hipotética *S. Agalactiae* desconocida (Q8CH3)	46	LPHTGE EKGFLSIIGGTILSFVAFLFKKKITLN
P25	S00737	676	Proteína hipotética *S. Agalactiae* desconocida (Q8CMF2)	49	LPHTGE EGLSILTVIGASILSVLGLSVLKKFKEN
P26	224g12	649	Proteína (NC_003421) hipotética *Schizosaccharomyces pombe*	22	LPTTGD DQNLLVTLMSSLLLMSLGLGLKKKEDE
P27	113f05	1144	Peptidasa (NC_004070) C5a *S. pyogenes*	34	LPKTDS QKTMTFLGIAMLFGGILQVLWSYFKKRD
P115	69b12	818	Fosfodiesteresa ciclo-nucleótido *S. Suis* (AB066354)	64	LPKAGS QESKGLFFMGLSLLGLAGLITKKEERQ

TABLA 2. lipoproteínas Putativas de *S. uberis*

Proteína	contig. nr.	aa (nr.)	Homología de base de datos (no. de acceso)	% de Identidad	Señal de clasificación predicha
P30	**198g02**	**293**	proteína de unión fosfato *S.pneumoniae* (AAL00697.1)	**71**	**MKIMKMNKMLTLAVLTLSSFGLAAC**
P31	**111h03**	**451**	Proteína de unión azúcar *S.pneumoniae* (AAK75762.1)	**24**	**MSKKILKLATLAILPFVGLTAC**
P32	**32a09**	**309**	Adhesion laminación *S. Pyogenes* (AAL98544.1)	**62**	**MKRKFLSFILVLTFFLPFLVGLSAC**
P33	**71g04**	**314**	proteína de maduración proteasa *S. pyogenes* (AAK34209.1)	**61**	**MNTSKKIVTGFVTLASVLTLAAC**
P34	**113f05**	**416**	proteína de unión Maltosa/maltodextrina *S. Pyogenes* (AAL97920.1)	**85**	**MKSWQKIIVSGASLTLASTLLVGC**
P35	**121e03**	**212**	Proteína hipotetica *S. Pyogenes* (AAK34138.1)	**57**	**MIGLLMKTQKSITLLLLSVLC**
P36	**121e03**	**277**	proteína de unión ácido amino S.uberis (Af086736)	**97**	**MNLKKILLTTLALASTLFLVAC**
P37	**108f04**	**351**	Lipoproteína putativa S. pyogenes (AAK34087.1)	**78**	**MNKKFIGLGLASVAILSLAAC**
P38	**108f04**	**285**	proteína de unión fosfato *S. pyogenes* (AAK34100.1|)	**80**	**MKKFFLVGMLTLSMLTLTAC**
P39	**45f07**	**282**	Proteína de unión ácido amino *B. subtilis* (CAB12132.1)	**49**	**MKKLFIYLSLAFSLLVLGAC**

P40	198g02	310	Proteína de unión metal *S. pyogenes* (AAL97215.1)	79	MKKKLSLAIMAFLGLLMLGAC
P41	130c11	311	Proteína de unión ferricromo *S. pyogenes* (AAL97215.1)	70	MKKLLVTLVLIFSTLSLIAC
P42	130c11	307	Proteína hipotetica *S. pyogenes* (AAK33400.1)	70	MKIKLNRILFSGLALSILITLTGC
P43	130c11	281	Proteína hipotetica *S. pyogenes* (AAL97072.1)	76	MSYKKILGLIGLTLVSSVLVAC
P44	130c11	274	Proteína hipotetica *S. pyogenes* (AAL97071.1)	66	MTLKKNLGILSLTLGTLAILAAC
P45	240d11	434	Proteína de unión azucar *S. mutans* (AAN59568)	52	MIKFETKKGQKLFLFGLILCFC
P46	141f06	272	Proteína hipotetica *S. Pyogenes* (AAK33324.1)	67	MKVKKNIKIAALLPMLTLLAAC
P47	125g06	539	Proteína de unión substrato *S. Pneumoniae* (AAK75869.1)	76	MKKRWIASSVIVLASTIVLGAC
P49	122b05	347	trasportador ABC putativa *S. pyogenes* (AAM78733.1)	65	MNKKLTSLALLSAAIIPLAAC
P50	161c09	552	Asociada proteína hialuronato *S. equi* (AF100456)	79	MTVAQKSTFKRFGLGAVTLASAALLMAC
P51	198b02	268	Proteína de unión substrato *S. pyogenes* (AAL97497.1)	52	MKTKKILKAAIGLMTLVSMTAC
P52	198g02	270	Isomerasa trans-cis peptidil-prolilo *S. pyogenes* (AAM78928.1)	67	MKKIISFALLTLSLFSLSAC
P53	231c11	173	proteína hipotética *Methanosarcina acetivorans* (AAM03977.1)	29	MKKTFTSTLVLLSALMLTAC

P54	53f09	286	*S.uberis* streptoquinasa (AJ131604)	100	MKKWFLILMLLGIFGC
P55	68d07	127	Proteína hipotetica *S. pyogenes* (Ae014145)	61	MGNYFKSLCLLLFSFLLVAC
P56	69h12	357	sin homología	–	MSKIVKKIFFLTAFLIMFFLSAC
P57	87h02	390	Proteína de unión de amino ácido de cadena ramificada *S. pneumoniae* (Ae007382)	46	MKKKLLVSTIACLSLLSLAAC
P58	69h12	221	Hidrolasa asociada a pared celular *Clostridium acetobutylicum* (Ae007516)	44	MINKKIIFTSLTVICISNC
P112	231c11	320	Lipoproteína putativa *S. agalactiae* (NP_689064)	45	MKKGMRFSLILLALMLLTAC
P113	52g05	322	Proteína de unión L. lactis ribose (NP_689064.1)	59	MKCIKKLGFLALFLSMLLLLGAC
P117	198g02	291	Proteína de unión fosfato S. pneumoniae (AEOO7497)	72	MKMNKMLTLAVLTLSSFGLAAC

TABLA 3. Proteína de superficie putativa seleccionada/factor virulento de S. uberis

Proteína	contig. nr.	aa (nr.)	Homología de base de datos (no. de acceso)	% de Identidad	Señal de clasificación predicha
P2	**130c11**	**183**	proteína de membrana citoplásmica *S.pyogenes* (AAK33386.1)	**80**	-
P3	**130c11**	**297**	Proteína de choque térmico *S.pyogenes*	**66**	**MLYQQIAQNKRKTIFLILAFFFLLTAIGA (AE014141)**
P4	**198g02**	**452**	Sensor quinasa histidina S. pyogenes (AE014144)	**82**	-
P5	**67h05**	**362**	Proteína de unión colina *S. pyogenes* (AE006476)	**52**	**MKFIKILLSQIVSLFLLLTISLHALETVNA**
P6	**113f05**	**416**	Nucleasa entra en *AND S. pneumoniae (NP_346391.1)*	**60**	**MSNKYPSGKKISAILIALLITGLTALSQG**
P7	**231c11**	**300**	Transportador ABC *S.pyogenes* (AAL96916.1)	**47**	-
P9	**231c11**	**146**	Proteína competencia S. pyogenes (Ae014138)	**40**	**MKISCCHSKAFTLAESLLCLAVTTFTILLLSSSLAGV**
P21	**80b12**	**246**	Aciltransferasa S. Pyogenes (AAM79682.1)	**77**	-
P28	**130g06**	**246**	Hidrolasa peptidoglican S. pyogenes (Ae006536)	**60**	**MRFLKGKKVFLAVIGLAVMMTLVIMFQPQAKN**
P29	**224g12**	**550**	Proteína hipotética S. Pyogenes	**46**	**MKKIFQRKWFKRTSIVLGILLVALIALG (AAK34725.1)**
P59	**111h03**	**174**	*Corynebacterium jeikeium* YpkK	**43**	**MKKKFLKIMTCIIAICSIFPYLSSMASTVYA (AF486522_8)**

P60	113b07	248	Carboxipeptidasa D,D- *S. pyogenes* (AAM80142.1)	70	MMKNNKLLSFLFQLLVILLFIFCLFYYIKA
P61	130c11	195	N-acetil-muramidasa *S. pyogenes* (AAL98352.1)	45	MRNRLTFSYFIGIFLTFLFLLITPLIVNSQA
P62	130c11	421	Proteína DltD *S. Pyogenes*	67	MLRKLLTVGPVFLALLLVLVTIFS (AAM79598.1)
P63	114a06	878	Proteína de exclusión superficie *S. pyogenes* (AAK33344.1)	36	MEFENTKSNQIKTTLALTSTLALLGTGVGMGHTVNA
P64	115e06	428	Proteína hipotetica *S. pyogenes* (AAK33154.11)	57	MKKLLACMLMVFFLSPISVISTEKSIS
P65	115e06	400	Proteasa serina *S. pyogenes* (AAK34840.1)	71	MPVSKFKHFFKYIMIVGLGFIGGALAFFVMNLLPHPSST
P66	115e06	656	Proteína hipotética *S .pyogenes* (AAM80444.1)	71	MKKFRFETIHLVMMGLILFGLLALCVRIMQSKMLIILA
P67	115e06	302	Proteína hipotética *S. pyogenes* (AAK34806.1)	22	MKTWKKTILITSLCLLISGAALAGFGFIRGGWS
P68	115e06	216	Proteína hipotética *S. pyogenes* (AAK34820.1)	41	MIRKENFKKRYISFGILGFAVALLALVFAF
P69	121e03	185	Señal peptidasa I *S. pyogenes* (AAM79518.1)	54	MVKRDFIRNIILALLAIVIFILLRIFVFS
P70	129b04	318	Proteína hipotética *S. pyogenes* (AAM79277.1)	73	MKSFFNSRIWLGLVSVFFAIVLFLTA
P71	130c11	535	Proteína hipotética *S. Pyogenes* (AAK34403.1)	77	-
P72	130c11	739	Proteína IA de unión penicilina *S. pyogenes* (AAL98205.1)	80	-

P73	130g06	307	Proteína hipotética *S. pyogenes* (AAL97680.1)	68	MRRQKKQQKKIIPLFLILLFSTLLLFTGFLFKKELRA
P74	130g06	317	Proteína hipotética *S. pneumoniae* (AAK99735.1)	61	MFKKKLMLTGLILFSGMTVSTASA
P75	133f06	241	Proteína hipotética *S. pyogenes (AAM80084.1)*	29	MKPSNTEKLFLILSLLTLILAGSFYLFFARNHIGNA
P76	141f06	212	Aciertos no significativos	--	MKKIQKIFIALSTMILLLSNIFSTIIYA
P77	141f06	304	Pirofosforilasa glucosa-UDP *S.uberis* (Aj400707)	100	MTKVRKAIIPAAGLGTRFLPATKALA
P78	141g05	386	Proteína hipotética *S.pyogenes* (AAK34063.1)	48	-
P79	149b09	304	Proteína hipotética *S. pyogenes* (AAL97494.1)	63	-
P80	153a02	1058	Sintasa carbamoil fostafo *S. pneumoniae* (Q97QE4)	75	-
P81	153f08	518	Adhesión proteína *S. pyogenes* (AAL97448.1)	69	MKKKTLVMMGLAGLVAGGQLYQAKAVLA
P82	198g02	441	Kinasa histidina *S. pneumoniae* (AAL00696)	57	-
P83	198g02	288	Peb1 *S. thermophilus* (Af327739)	61	MKKFKPRKKSDIKRRIAMNQFKKWTFFCLMTLLTLIFMPKASA
P84	198g02	126	Aciertos no significativos	--	MLLRKARHSLKRRHMMLEVLLIVSTFFLFHIFISLLIGIKRRS
P85	224g12	774	Proteína de unión penicilina *S. pyogenes 2A* (AAL98575.1)	77	-

P86	224g12	498	Dipeptidasa *S. pyogenes* (AAM80370.1)	80	MNTKKFTLATVTVMTALACYSSA
P87	224g12	386	Aciertos no significativos	--	MFKTKKEIFSIRKTALGVGSVLLGVILTTQVASA
P88	231c11	119	Proteína hipotética S. pyogenes (Ae009962)	37	-
P89	231c11	772	Proteína IB de unión penicilina S. pyogenes (AAK33215.1)	77	-
P90	238b05	331	Proteína hipotética S. pyogenes (AAL97637.1)	63	-
P91	238b05	550	Proteína A80 similar a proteína de union de proteína *S. pyogenes fibronectin* (AAK33911.1)	80	-
P92	240d11	200	Aciertos no significativos	--	MANYKKITSLSLLTLLSLATFSATQYSKVYA
P93	31e02	758	Amidasa N-acetilmuramoil-L-alanina *Bacillus halodurans (BAB07384.1)*	32	MKSKKSYVLLLAPFVLASFWQSKMVSA
P94	38f04	143	Proteína hipotética S. pyogenes (AAK34637.1)	27	MKKRKNKWRFFMIKMRKSQLSVSLALFALLTFAASPIYA
P95	40c10	747	Proteína de unión 2X penicilina S. pyogenes (AAK34426.1)	74	-
P96	45f07	200	S. suis Cps9F (AAF18949)	77	MYQVVKRLLAILISGLAIIILSPVLLAVAIA
P97	45f07	424	S. agalactiae CpsA (AF349539)	61	MASLLLLILLKKAKLLTMIGLILANIGLAVTLFA
P98	52g05	347	Proteína hipotética S. pyogenes (AAK34330.1)	68	MKVIKTYKWWVLSILSMVLILFALFFPLPYYIEMPGGA

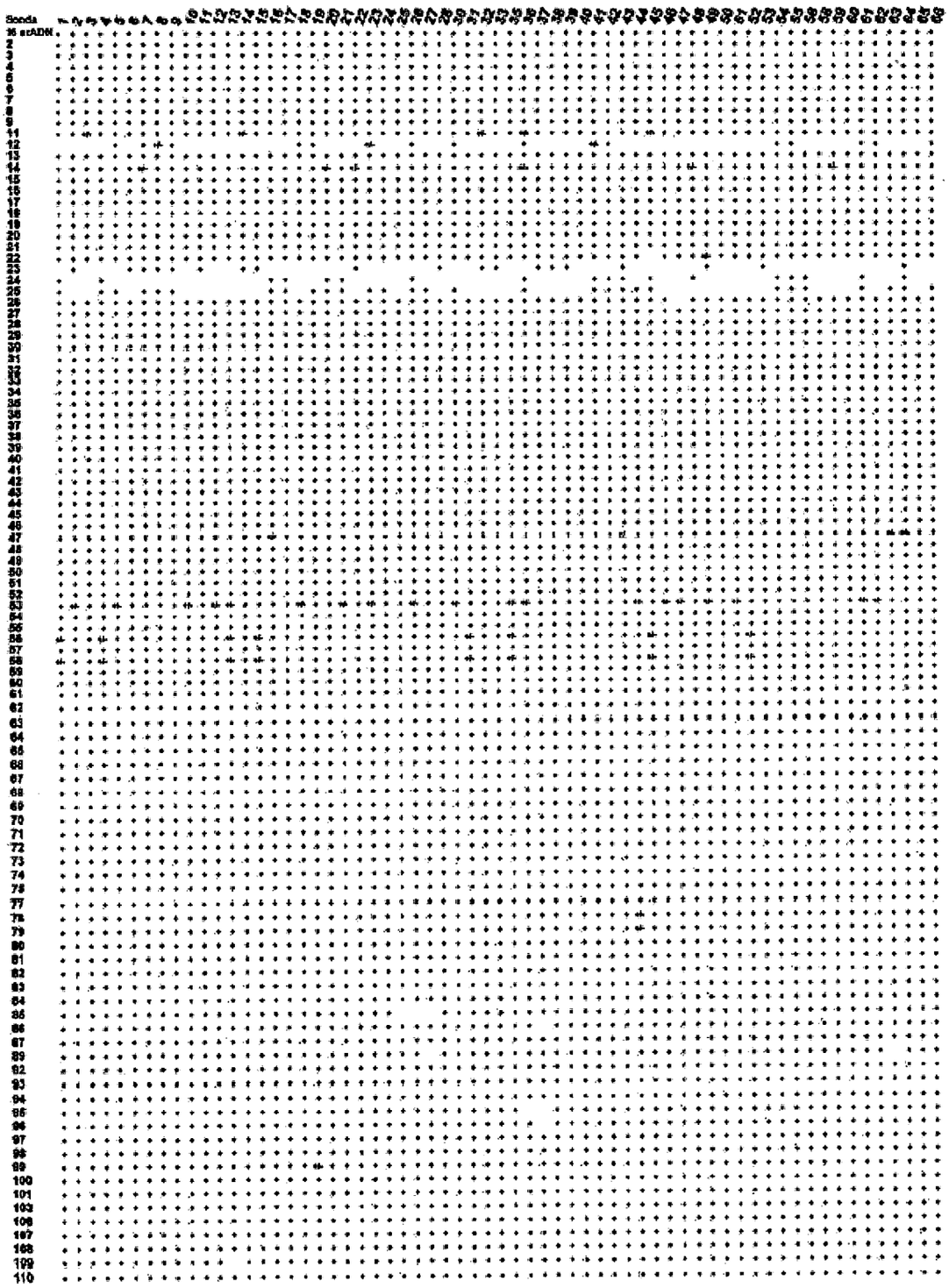
P99	52g05	506	Amidasa *B. anthracis* (NP _655785)	40	-
P100	53f09	169	Proteína desconocida *L. lactis* (AAK04688.1)	50	-
P101	67h05	425	Glicoproteína immunodominante *S. mutans* (AAK9450 1.1)	41	MKKRILSAVLVSGVTLGTATTVNA
P102	67h05	137	Proteína hipotética S. pyogenes (AAL96870.1).	57	-
P103	68d07	280	Endolisina S. Pyogenes (AAL97346.1)	73	MRRRIKPIVVLVFFLLFALLLIIGKTHS
P104	71g04	429	Deacetilase GlcNAc de peptidoglican putativo S. pyogenes (AAM79651.1)	47	MKKFYVIVGTLLSIFILSVSLFVYS
P105	71g04	727	Internalina A S. pyogenes (AAL97968.1)	52	MKKKTYLFVAGITVTCGTAL
P106	77f12	393	Carboxipeptidasa S. Pyogenes D D (AAM78820.1)	62	MIKKILLFLSIFALTISTIPVIA
P107	77f12	400	Carboxipeptidasa D-alanil-D-alanine S. Pyogenes (AAM78821.1)	38	MKKTILSTIIVGLFLWTLSTLVLA
P108	77f12	415	Carboxipeptidasa D-alanil-D-alanine S. Pyogenes (AAM78821.1)	60	MKKMLLLCFIFLILFPINFVNA
P109	80b12	202	Dismutasa [Mn] superoxido S. pyogenes (AAM79678.1)	89	-
P110	80b12	350	Proteína hipotética S. Pyogenes (AAL98000.1)	71	MRLQMMTFLRKINSTKVLIFLCVSLFLGLVVTVSA
P111	198g02	128	Proteína hipotética S. pneumoniae (AAL00353.1)	36	MKRKISLFLFLASIFATTNSVFA

P116	84d07	427	*S. pyogenes* RopA (AAM80241.1)	82	-
P118	108f04	115	Proteína hipotética *S. pyogenes* (AAL97738.1)	34	MKAKRDGLIIGLVTGVVAGTLSYLSLSHS
P119	113f05	301	Transferasa isopentenilpirofosfato tRNA *S.pyogenes* (AAL97618.1)	68	MTKKEKIIVIVGPTAVGKTALGIQVAQA
P120	115e06	216	Dehidrogenasa hidroxibutiril-CoA *Bacillus halodurans* (BAB05714.1)	52	MTNIKTIGVVGAGAMGGGIANLFA
P121	115e06	287	Dehidrogenasa 3-hidroxibutiril-CoA *B. halodurans* (BAB05714.1)	43	MTNIKTIGVVGAGAMGGGIANLFA
P122	130c11	589	Liasa aminodesoxicorismato *S. pyogenes* (AAL97146.1)	52	-
P123	130g06	331	Reductasa tiorredoxina *S. pyogenes* (AAM79182.1)	80	-
P124	130g06	203	hydrolasa peptidoglican S. *pyogenes* (AAK33784.1)	68	-
P125	130g06	246	hydrolasa peptidoglican *S. pyogenes* (AAK33785.1)	61	MRFLKGKKVFLAVIGLAVMMTLVIMFQPQAKNKSVSAE
P126	130g06	357	spermidina/putrescina ABC *S. pyogenes* (AAK33983.1)	80	MRRLYSFIAGVLGHLILASSTFILQKKTGSA
P127	130g06	200	Proteína hipotética *S. pyogenes* (AAL97729.1)	74	-
P128	133f06	609	Oxidasa alfa glicerofosfato *S. pyogenes* (AAK34439.1)	80	-
P129	198g02	337	Autolisina *Listeria monocytogenes* (AF035424)	38	-

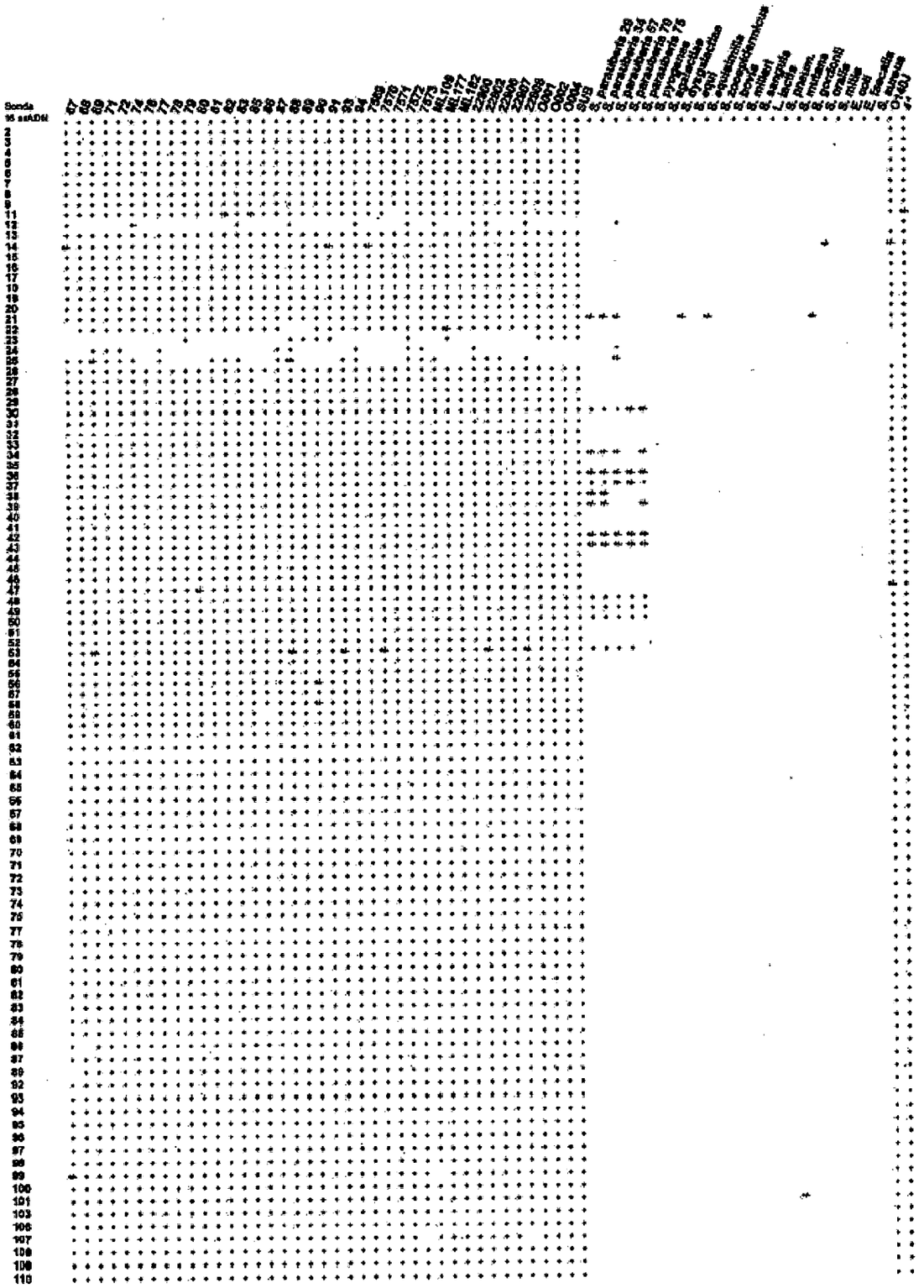
P130	19e05	289	Proteína hipotetica *S. pyogenes* (AAM79683.1)	78	-
P131	224g12	545	Proteína hipotética *S. pyogenes* (AAK34725.1)	46	MKKIFQRKWFKRTSIVLGILLVALIALGS
P132	240d11	308	Proteína desconocida *L. lactis* (AAK06265.1)	29	MKSNDPLALLAKKRRRKTFLMTIVFSLLATLLLFALCFKLLS
P133	240d11	322	Transportador ABC de Ribosa *Clostridium acetobutylicum* (AAK79421.1)	39	-
P134	24d11	485	Proteína hipotética *Staphylococcus aureus* (BAB95577.1)	29	MLSYRVVKRRLGMVKKQVAIGMGVSGLAVLLALS
P135	241b08	195	Proteína hipotética S. pyogenes (AAK34290.1)	58	MRKKRTINWWKWSFLILLALNLAFVCVIA
P136	45f07	347	Transferasa glicosil *Chlorobium tepidum* (AAM71444.1)	31	-
P137	52g02	393	Proteína de división celular *Streptococcus pyogenes* (AAK34317.1)	43	-
P138	68d07	280	Endolisina *S. pyogenes* (AAL97346.)	73	MRRRIKPIVVLVFFLLFALLLIIGKTHSD
P139	7f09	197	Peptidasa señal I *S. pyogenes* (AAK34563.1)	69	MKHFFKEWGLFTLVILIFGISRLFFWQPVKVDG

256

Tabla 4 Cepa

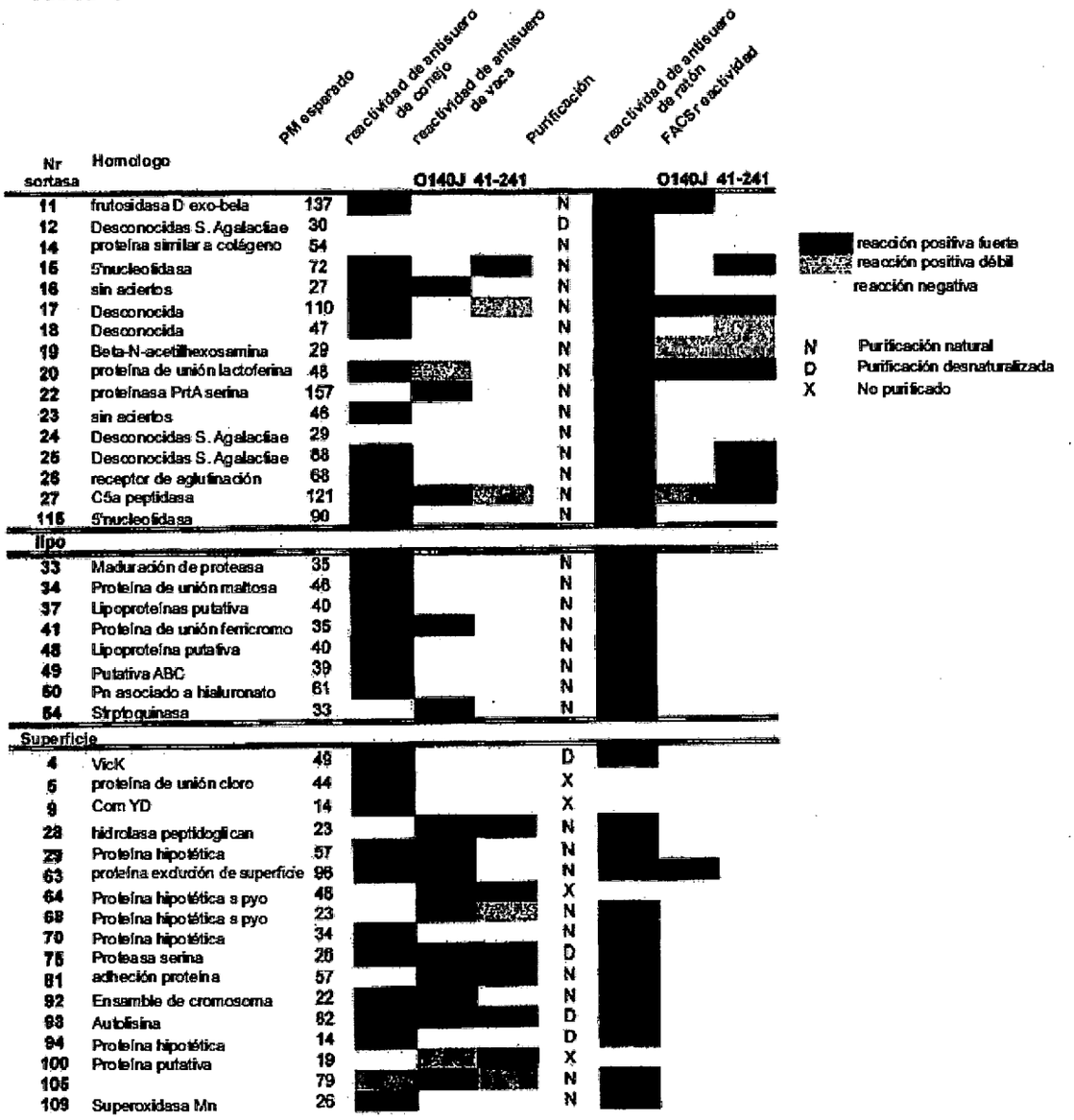


257



258

Tabla 5



Nr sortasa	Homologo		
11	frutosidasa D exo-bela	137	N
12	Desconocidas S. Agalactiae	30	D
14	proteína similar a colágeno	54	N
15	5'nucleotidasa	72	N
16	sin aciertos	27	N
17	Desconocida	110	N
18	Desconocida	47	N
19	Beta-N-acetilhexosamina	29	N
20	proteína de unión lactoferina	48	N
22	proteinasa PrtA serina	157	N
23	sin aciertos	46	N
24	Desconocidas S. Agalactiae	29	N
25	Desconocidas S. Agalactiae	88	N
26	receptor de aglutinación	68	N
27	C5a peptidasa	121	N
116	5'nucleotidasa	90	N
lipo			
33	Maduración de proteasa	35	N
34	Proteína de unión maltosa	46	N
37	Lipoproteínas putativa	40	N
41	Proteína de unión fericromo	35	N
48	Lipoproteína putativa	40	N
49	Putativa ABC	39	N
50	Pn asociado a hialuronato	61	N
54	Strptoquinasa	33	N
Superficie			
4	VicK	49	D
5	proteína de unión cloro	44	X
9	Com YD	14	X
28	hidrolasa peptidoglican	23	N
29	Proteína hipotética	57	N
63	proteína exdución de superficie	96	N
64	Proteína hipotética s pyo	45	X
68	Proteína hipotética s pyo	23	N
70	Proteína hipotética	34	N
75	Proteasa serina	26	D
81	adhesión proteína	57	N
92	Ensamble de cromosoma	22	N
93	Autolisina	82	D
94	Proteína hipotética	14	D
100	Proteína putativa	19	X
105		79	N
109	Superoxidasa Mn	26	N

TABLA 6. Proteína imunogenica de S. Uberis identificada en geles 2D y caracterizada por espectrometría de masa

Spotnr.	Nombre de proteína	Masa (kDa)	pI
1	proteína de exclusión de superficie	94,8	5,8
2	Factor activador (ropA)	47,3	4,3
3	Quinasa difosfato nucleótido	16,2	5,7

TABLA 7. Resumen de los resultados de infecciones intramamarias experimentales por cepas S. Uberis o 140J y 41-241

Cepa de vaca No.		Después de experimento de inoculación de ultima dosis (cfu)		max. SCC	SCC antes de inoculación	max. Temp	No. de cuartos infectados exitosamente	Clasificación[1] max. BO	Clasificación[2] max. Coágulos en leche	Clasificación[3] max. Consistencia de la ubre
6716	O140J	50 Horas	5×10^2	$2{,}9 \times 10^7$	$2{,}7 \times 10^4$	40,2	2	3	0	0
6717	O140J	80 Horas	5×10^2	$9{,}7 \times 10^5$	$1{,}2 \times 10^5$	38,6	1	1	0	0
6720	41-241	45 Horas	5×10^3	$2{,}8 \times 10^7$	$4{,}8 \times 10^4$	40,8	2	3	2	0
6721	41-241	67 Horas	5×10^2	$7{,}2 \times 10^6$	0.9×10^5	38,7	2	3	1	0
6718	O140J	16 Días	5×10^2	$2{,}9 \times 10^7$	0.9×10^5	40,9	2	3	4	3
6719	O140J	16 Días	5×10^2	$2{,}4 \times 10^7$	0.9×10^5	40,0	1	3	3	3
6722	41-241	16 Días	5×10^3	$2{,}7 \times 10^7$	$4{,}4 \times 10^4$	41.0	2	3	3	2
6723	41-241	16 Días	5×10^2	$2{,}1 \times 10^7$	$3{,}6 \times 10^4$	39,5	2	3	2	1

[1)] clasificacion: BO negativo: 0;<10^3 cfu/ml leche: 1;10^3 <10^5 cfu/ml leche: 2: >10^5 cfu/ml leche: 3
[2)] leche normal: 0; pocos coágulos: 1; numerosos coágulos:2; leche con pus: 3; leche con sangre; 4.
[3)] clasificación de consistencia: consistencia normal: 0; cambios leves:1; cambios moderados: 2; cambios severos: 3.

261

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una proteína *Streptococcus* que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus*, el método comprende:

a) identificar por lo menos parte de una proteína secretada, una proteína asociada a superficie y/o una proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano;

b) seleccionar por lo menos una proteína identificada en la etapa a) que se conserva sobre por lo menos dos cepas de *Streptococcus* y/o serotipos; y

c) determinar si por lo menos una proteína seleccionada en la etapa b) o una parte inmunogénica, derivado, y/o análogo de la misma es capaz de unir específicamente un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado mediante una primera cepa de *Streptococcus* y/o serotipo, y un anticuerpo y/o célula inmunológica de un animal infectado mediante una segunda cepa de *Streptococcus* y/o serotipo.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína secretada y/o proteína asociada con superficie se identifica al identificar en por lo menos parte de la secuencia genómica del *Streptococcus* un gen que comprende un motivo de una proteína asociada con superficie y/o secretada.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano se identifica al identificar en por lo menos parte de la

secuencia genómica del *Streptococcus* un gen que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un gen de factor de virulencia bacteriano.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o 3, en donde dicha proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano se identifica al identificar por lo menos en parte de la secuencia genómica del *Streptococcus* un gen que hibrida con la secuencia de nucleótido de longitud completa de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico listadas en la Figura 4 a 65° C en un amortiguador que tiene 0.5 M de fosfato de sodio, 1 mM EDTA, y 7% de dodecil sulfato de sodio en un pH de 7.2,

en donde la molécula de ácido nucleico permanece hibridada después de lavar dos veces con un amortiguador que contiene 40 mM de fosfato de sodio (pH 7.2),

1 mM EDTA y 5% de dodecil sulfato de sodio durante 30 minutos a 65° C y; lavar dos veces con un amortiguador que contiene 40 mM de fosfato de sodio (pH 7.2), 1 mM EDTA y 1% dodecil fosfato de sodio durante 30 minutos a 65° C.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, 3 o 4, que comprende adicionalmente seleccionar un gen que se conserva sobre por lo menos dos cepas de *Streptococcus* y/o serotipos.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende adicionalmente obtener una proteína codificada mediante dicho gen, o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de dicha proteína.

7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde dicho gen se expresa en un sistema de expresión procariótico.

8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende:

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

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende adicionalmente expresar dicha proteína utilizando una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha proteína.

10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicho anticuerpo y/o célula inmunológica se deriva de un suero de convalescente.

11. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicha proteína de *Streptococcus* es capaz de provocar anticuerpos que inducen opsonofagocitosis.

12. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde se identifican por lo menos dos proteínas de *Streptococcus* capaces de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus*.

13. Un método para producir por lo menos una proteína identificada mediante un método de acuerdo con una cualquier de las reivindicaciones 1-12.

14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde dicho *Streptococcus* es de *Streptococcus uberis*.

15. Una proteína de *Streptococcus* que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus* que se pueden obtener mediante un método de acuerdo con cualquiera una de las reivindicaciones 1-14.

16. Uso de una proteína que se puede obtener mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo, para la preparación de una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus*.

265

17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha proteína se selecciona de la Tabla 5 y/o Tabla 6.

18. Una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus* que comprende por lo menos una proteína aislada y/o recombinante que se puede obtener mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo.

19. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 18 que comprende por lo menos dos proteínas aisladas y/o recombinantes, y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo, que se puede obtener mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

20. Una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus* que comprenden por lo menos una molécula de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína que se puede obtener mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de dicha proteína.

21. Una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en donde dicho *Streptococcus* es *Streptococcus uberis*.

22. Una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18-20, en donde por lo menos uno, preferiblemente por lo menos dos de dichas proteínas se seleccionan de la Tabla 5 y/o Tabla 6.

23. Un método para producir una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus*, dicho método que comprende suministrar una célula con por lo menos un vector recombinante, dicho por lo menos un vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína que se puede obtener mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y/o por lo menos una proteína seleccionada de la Tabla 5 y/o Tabla 6, y/o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo del mismo.

24. Una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos dos proteínas que se pueden obtener mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y/o por lo menos dos proteínas seleccionadas de la Tabla 5 y/o Tabla 6, y/o una parte inmunogénica de por lo menos una de dichas proteínas, bajo el control de un promotor ligado funcionalmente.

25. Un portador recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica por lo menos dos proteínas que se pueden obtener mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y/o seleccionadas de la Tabla 5 y/o Tabla 6, y/o una parte inmunogénica de por lo menos una de dichas proteínas, o una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 24.

26. Un portador recombinante de acuerdo con la reivindicación 25 que es un portador vivo.

27. Un portador recombinante de acuerdo con la reivindicación 25 o 26, que son es una especie *Streptococcus*.

28. Un portador recombinante de acuerdo con la reivindicación 27, en donde dicha especie *Streptococcus* es un *Streptococcus uberis*.

29. Un portador recombinante de acuerdo con la reivindicación 27 o 28, en donde a dicho *Streptococcus*, le falta por lo menos parte de un producto de expresión génico capsular.

30. Un portador recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 27-29, en donde dicho *Streptococcus*, es un *Streptococcus* no capsular.

31. Un portador recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-30, que comprende un ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína y/o parte inmunogénica de la misma derivada de una primera cepa de *Streptococcus* y/o serotipo, y un ácido nucleico que codifica por lo menos una proteína y/o parte inmunogénica de la misma derivada de una segunda cepa de *Streptococcus* y/o serotipo.

32. Una célula anfitriona aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos dos proteínas que se pueden obtener

mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y/o seleccionada de la Tabla 5 y/o Tabla 6, y/o una parte inmunogénica de por lo menos una de dichas proteínas, o una molécula de ácido nucleico recombinante de acuerdo con la reivindicación 24 o un portador recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-31.

33. Una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus*, dicha composición comprende un portador recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 25-31.

34. Una composición inmunogénica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-22 y/o 33 para uso como un medicamento.

35. Uso de una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18-22 y/o 33 para la preparación de un medicamento contra mastitis por *Streptococcus uberis*.

36. Uso de una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18-22 y/o 33 para la preparación de una vacuna.

37. Un método para la reducción y/o control del número de organismos de *Streptococcus* en un individuo y/o animal no humano que comprende proporcionar a dicho individual y/o animal no humano una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18-22 y/o 33.

38. Una composición farmacéutica que comprende una composición inmunogénica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18-22 y/o 33 y un portador adecuado, diluyente y/o excipiente.

39. Un método para medir la inmunidad de un individuo y/o animal no humano contra *Streptococcus*, dicho método comprende determinar en por lo menos una muestra de dicho individuo y/o animal la presencia de anticuerpos dirigidos contra una proteína que se puede obtener mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y/o seleccionados de la Tabla 5 y/o Tabla 6, o una parte inmunogénica de la misma.

40. Un equipo para diagnóstico que comprende por lo menos una proteína que se puede obtener mediante un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y/o seleccionadas de la Tabla 5 y/o Tabla 6, o una parte inmunogénica de la misma, y unos medios para detectar anticuerpos que se unen a dicha proteína o parte inmunogénica de la misma.

41. Una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis* que comprende por lo menos dos proteínas de superficie recombinantes y/o aisladas derivadas de por lo menos una cepa de *Streptococcus uberis*, y/o una parte inmunogénica o análogo o derivado de cualquiera o ambas de dichas proteínas.

42. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 41, en donde dicha por lo menos dos proteínas se seleccionan de la Tabla 5 y/o Tabla 6.

43. Un método para producir una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 41 o 42, dicho método comprende suministrar una célula con un vector recombinante, dicho vector comprende un ácido nucleico que codifica por lo menos dos proteínas como se lista en la Tabla 5 y/o Tabla 6, y/o una parte inmunogénica o análogo o derivado de cualquiera o ambas de dichas proteínas.

44. Un método de acuerdo con la reivindicación 43, que comprende suministrar por lo menos dos células con un vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 43 y/o un vector recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína como se lista en la Tabla 5 y/o Tabla 6, y/o una parte inmunogénica o análogo o derivado de cualquiera o ambas de dichas proteínas.

45. Una molécula recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína como se lista en la Tabla 5 y/o Tabla 6, y/o una parte inmunogénica o análogo o derivado de la misma bajo el control de un promotor ligado funcionalmente.

46. Una molécula recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica por lo menos dos proteínas como se lista en la Tabla 5 y/o Tabla 6, y/o una parte inmunogénica o análogo o derivado de cualquiera o ambas de dichas proteínas bajo el control de un promotor ligado funcionalmente.

47. Un portador recombinante vivo que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 45 o 46.

48. Una célula anfitriona aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 45 o 46.

49. Una molécula proteinácea aislada y/o recombinante que tiene por lo menos 80% de identidad de secuencia con una proteína codificada por un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 45 o 46.

50. Una molécula proteinácea recombinante y/o aislada que tiene por lo menos 95% de identidad de secuencia con una molécula proteinácea codificada por un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 45 o 46.

51. Una molécula proteinácea recombinante y/o aislada que comprende una tira de por lo menos 25 aminoácidos consecutivos de una molécula proteinácea codificada por un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 45 o 46.

52. Un ácido nucleico que codifica una molécula proteinácea de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49 a 51.

53. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 40 o 41, dicha composición comprende una molécula proteinácea aislada y/o recombinante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 49 a 51.

54. Una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis*, dicha composición comprende

un portador recombinante vivo o muerto de acuerdo con la reivindicación 47.

55. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 54, en donde dicho portador recombinante vivo o muerto es una especie de *Streptococcus*.

56. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 54 o 55, en donde dicho portador recombinante vivo o muerto es *Streptococcus uberis*.

57. Una composición inmunogénica capaz de provocar una respuesta inmunológica contra *Streptococcus uberis*, dicha composición comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 45 o 55.

58. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 41 o 42 y/o reivindicaciones 53 a 57 como un medicamento.

59. Uso de una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 41 o 42 y/o reivindicaciones 53 a 57 para la preparación de un medicamento contra mastitis por *Streptococcus uberis*.

60. Uso de una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 41 o 42 y/o reivindicaciones 53 a 57 para la preparación de una vacuna.

61. Uso de una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 41 o 42 y/o reivindicaciones 53 a 57 para reducir y/o controlar el número de organismos de *S. uberis* en la leche y/o ubre de una vaca.

62. Una composición farmacéutica que comprende una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 41 o 42 y/o 53 a 57 y un portador adecuado.

63. Un método para medir la inmunidad de un animal contra *S. uberis*, dicho método comprende determinar por lo menos una muestra de dicho animal la presencia de anticuerpos dirigidos contra una proteína seleccionada de la Tabla 5 y/o Tabla 6, o una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 51 o una parte inmunogénica de la misma.

64. Un equipo para diagnóstico que comprende por lo menos una proteína seleccionada de la Tabla 5 y/o Tabla 6, o una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 49 a 51 o una parte inmunogénica de la misma y unos medios para detectar anticuerpos que se unen a dicha proteína o parte inmunogénica de la misma.

65. Un método para detectar cepas inmunogénicas de *S. uberis*, dicho método comprende aislar ácido nucleico de un organismo *S. uberis* de un caso de mastitis, someter dicho ácido nucleico a un PCR que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 45, 46 o 52, o un cebador del mismo.

PROTEÍNAS DE STREPTOCOCCUS INMUNOGÉNICAS

Resumen

La invención suministra medios y métodos para identificar una proteína *Streptococcus* que es capaz de provocar una respuesta inmune contra por lo menos dos cepas de *Streptococcus* y/o serotipos. La invención describe adicionalmente composiciones inmunogénicas capaces de provocar una respuesta inmune contra *Streptococcus uberis* que comprende por lo menos dos proteínas recombinantes y/o aisladas derivadas de *Streptococcus uberis*, y/o una parte inmunogénica derivada o análogo o derivado de cualquiera o ambas de dichas proteínas. La invención describe adicionalmente moléculas de ácido nucleico que codifiquen dichas proteínas o partes inmunogénicas de las mismas, células anfitrionas y portadores recombinantes que comprenden tales moléculas de ácido nucleico, y vacunas y pruebas para diagnóstico basadas en dichas proteínas y ácidos nucleicos.

Fig. 1A

Análisis FACS en cepa *S. uberis* 41-241 intacta

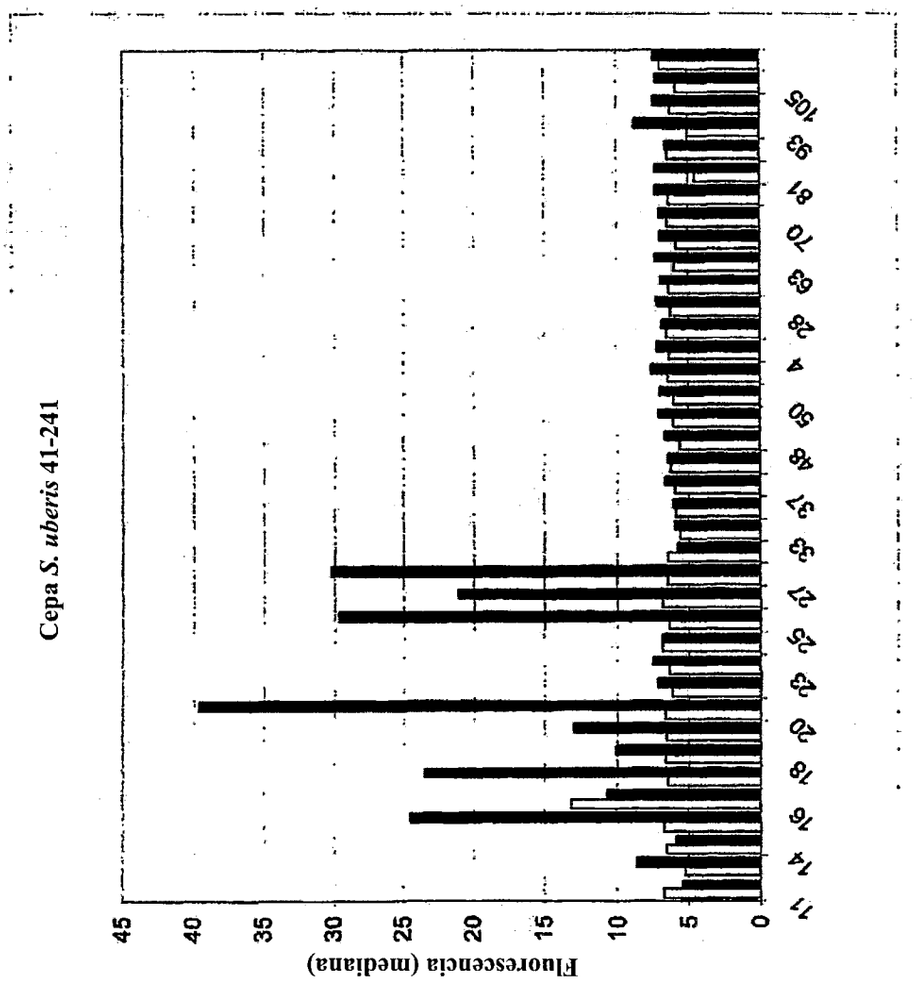
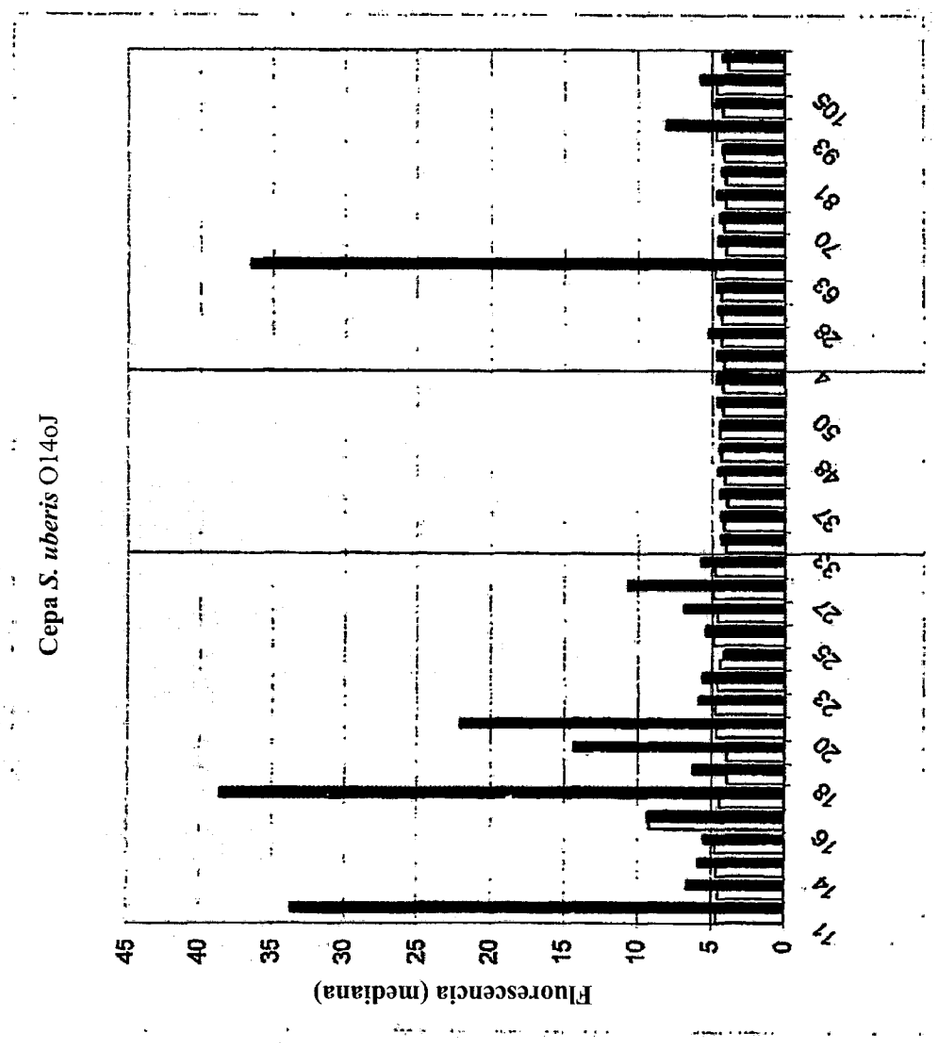
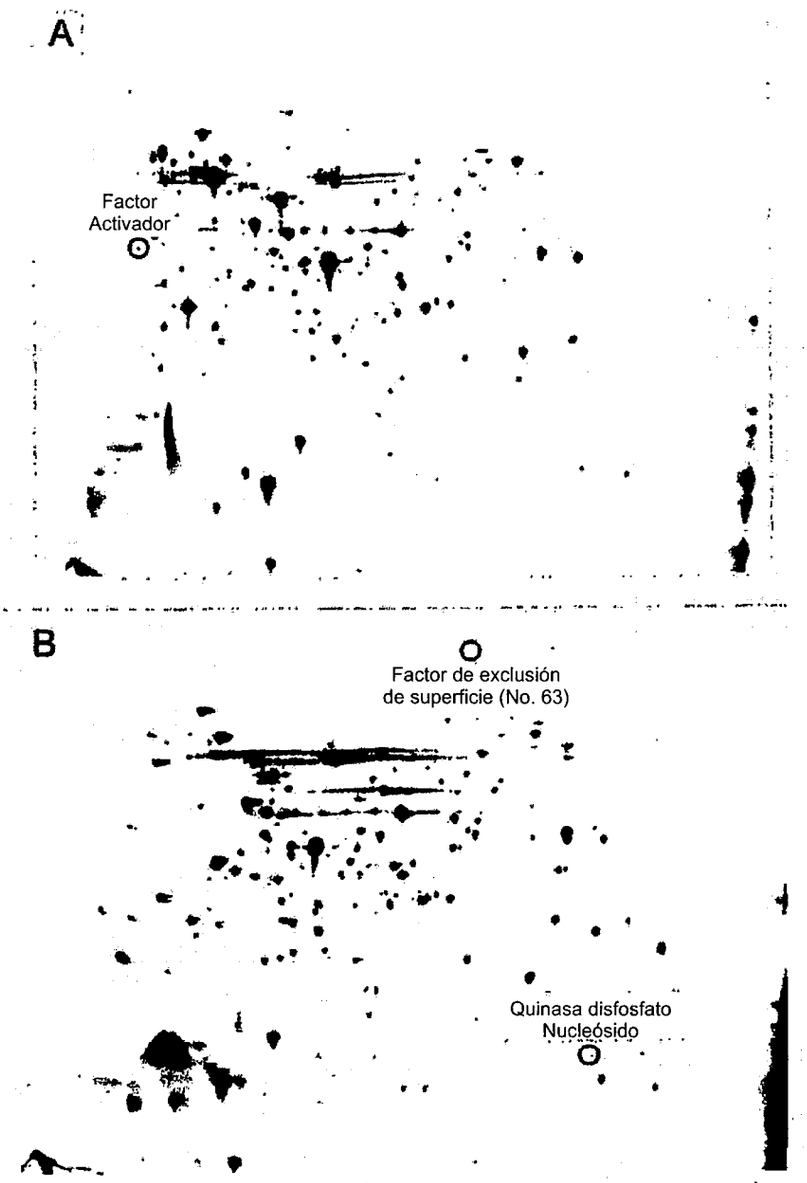


Fig. 1B

Análisis FACS en cepa *S. uberis* O14oJ intacta





Patrones proteoma 2D teñido con azul brillante Coomassie

Fig. 2

Fig. 3A

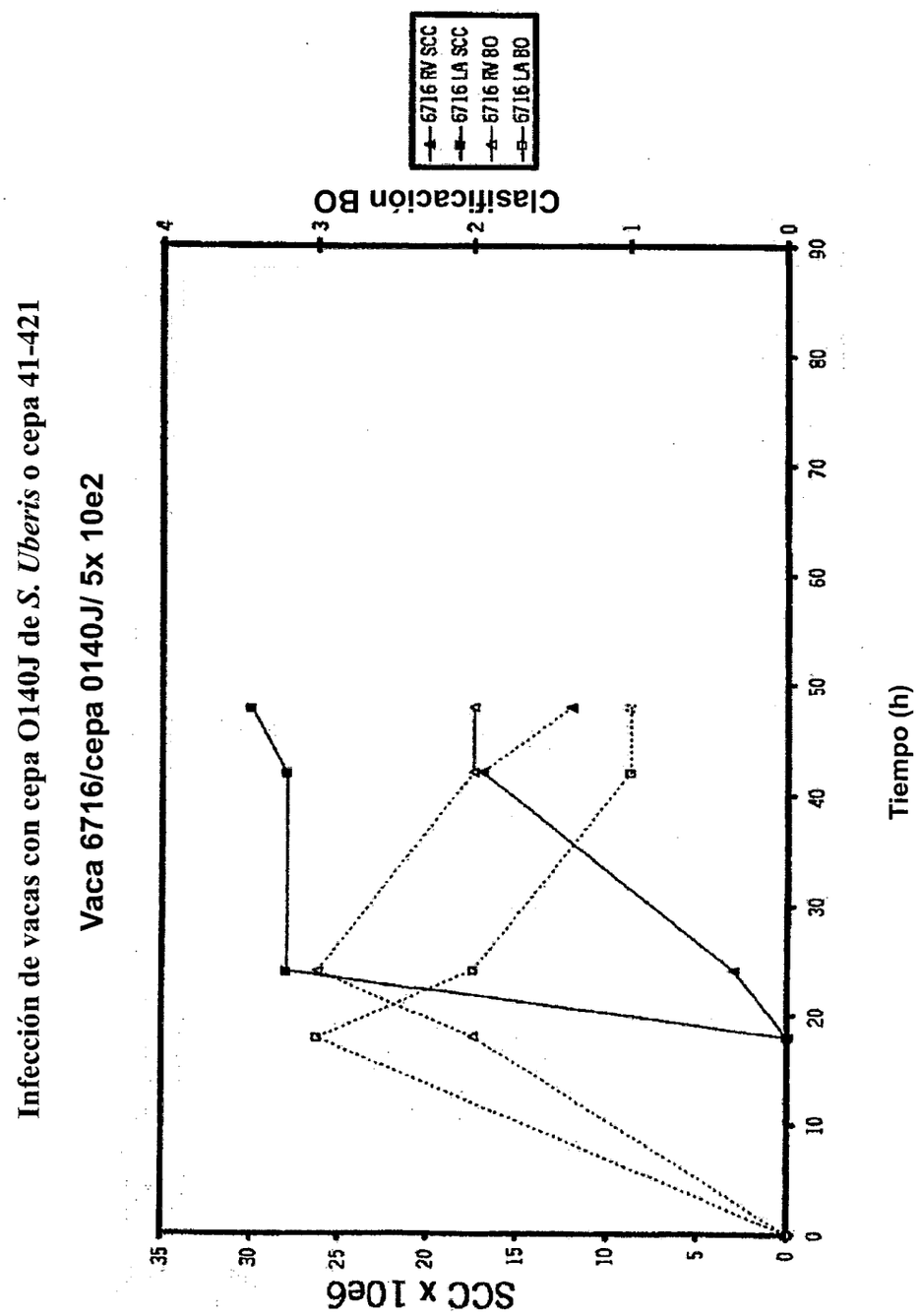

Infección de vacas con cepa O140J de S. Uberis o cepa 41-421
Vaca 6716/cepa 0140J/ 5x 10e2
6716 RV SCC
6716 LA SCC
6716 RV BO
6716 LA BO
Clasificacion BO
SCC x 10e6
Tiempo (h)

Fig. 3A, Condt.

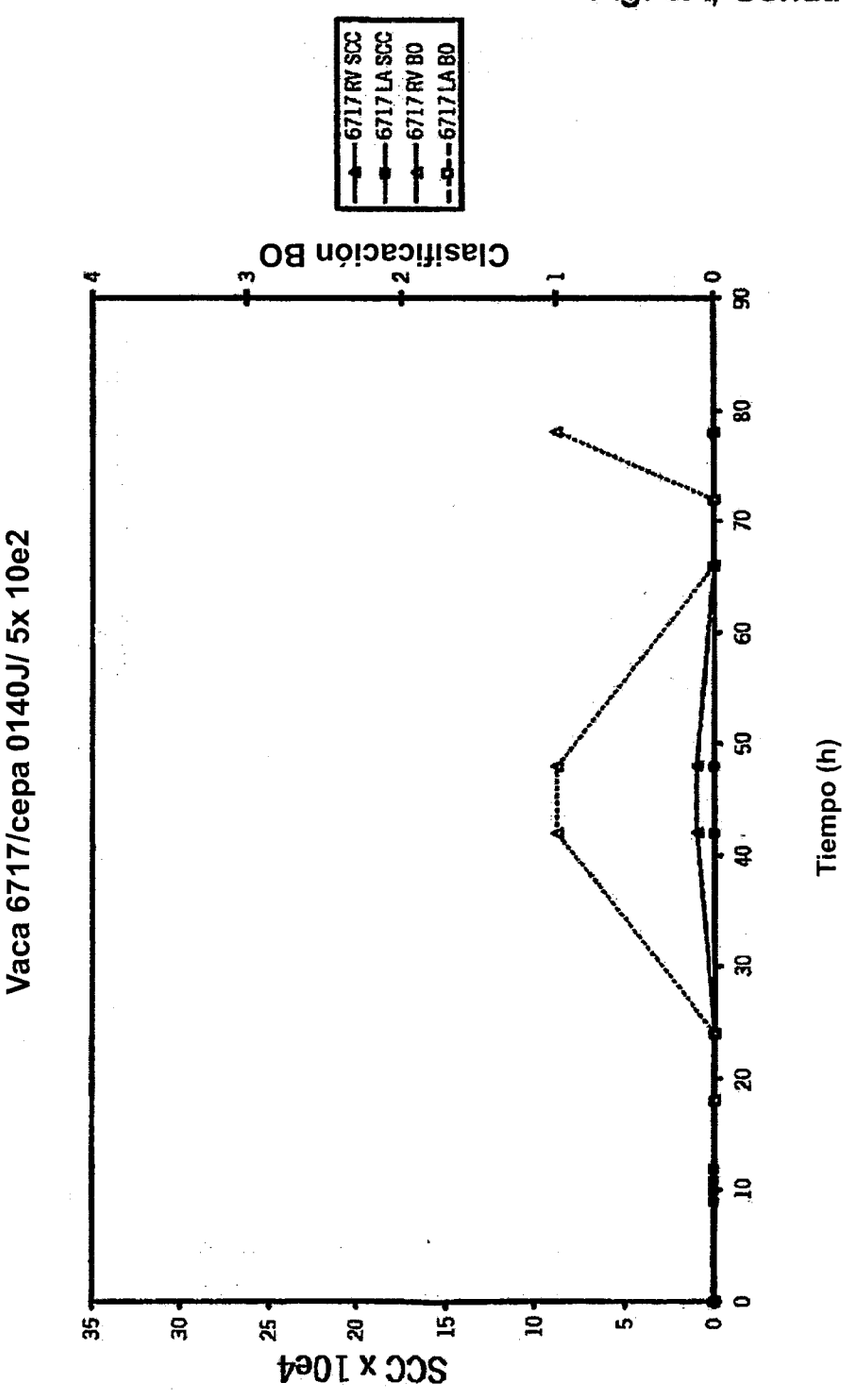

6717 RV SCC
6717 LA SCC
6717 RV BO
6717 LA BO
Clasificacion BO
Vaca 6717/cepa 0140J/ 5x 10e2
SCC x 10e4
Tiempo (h)

Fig. 3A, Condt.

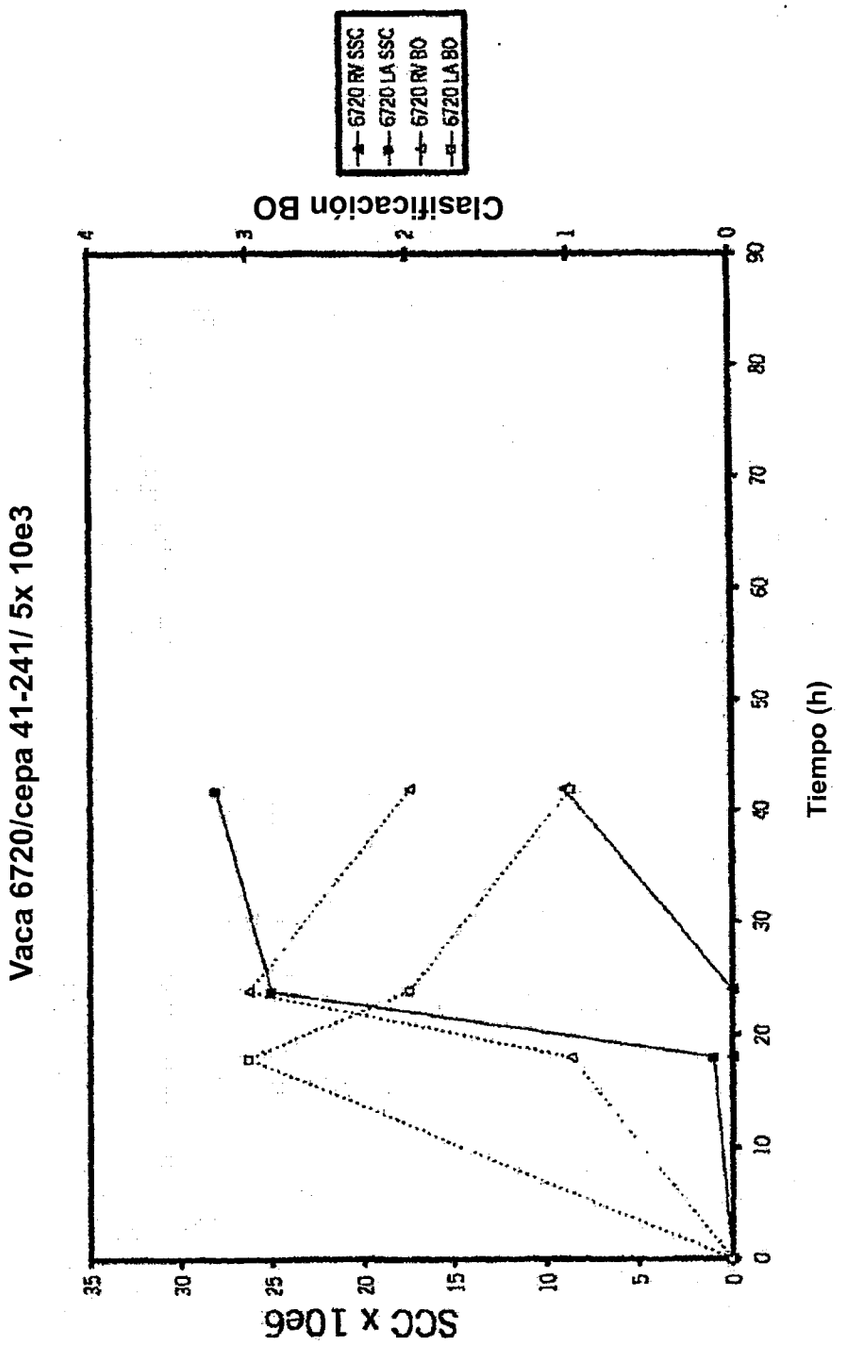

6720 RV SSC
6720 LA SSC
6720 RV BO
6720 LA BO
Clasificacion BO
Vaca 6720/cepa 41-241/ 5x 10e3
SCC x 10e6
Tiempo (h)

Fig. 3A, Condt.

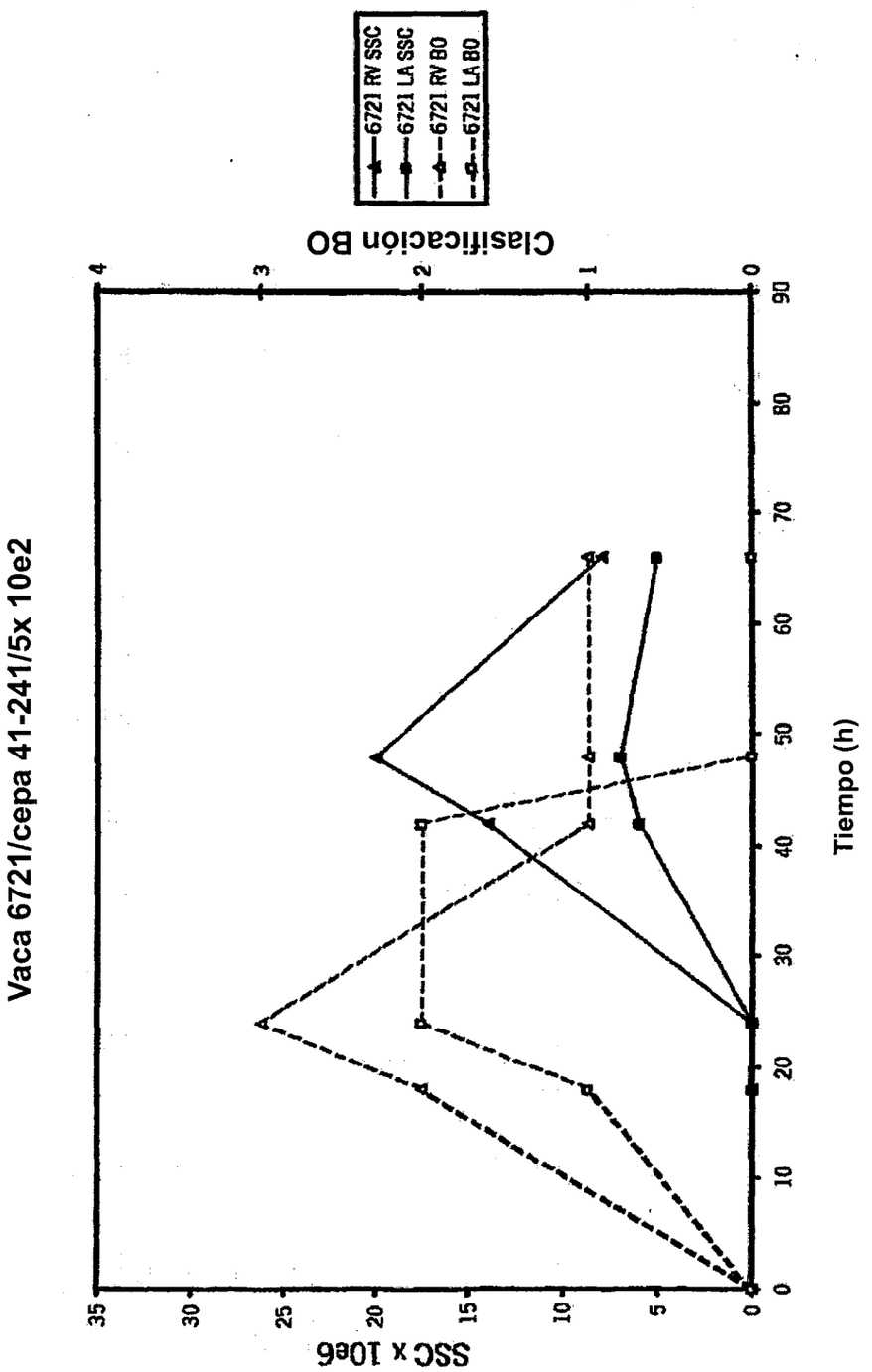

6721 RV SSC
6721 LA SSC
6721 RV BO
6721 LA BO
Clasificación BO
SSC x 10e6
Tiempo (h)
Vaca 6721/cepa 41-241/5x 10e2

Fig. 3B

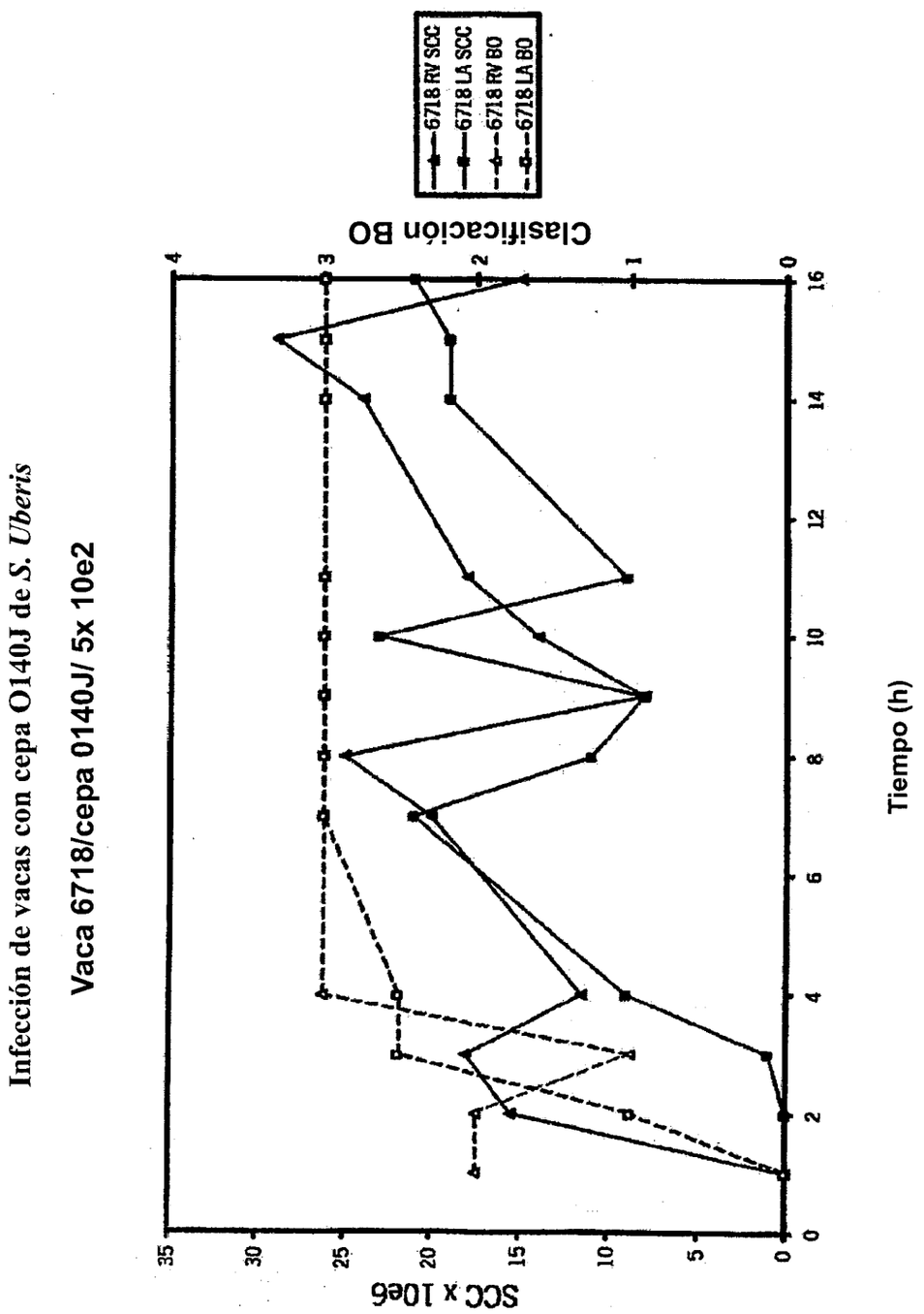

Infección de vacas con cepa O140J de S. Uberis
Vaca 6718/cepa 0140J/ 5x 10e2
6718 RV SCC
6718 LA SCC
6718 RV BO
6718 LA BO
Clasificación BO
SCC x 10e6
Tiempo (h)

Fig. 3B, Condt.

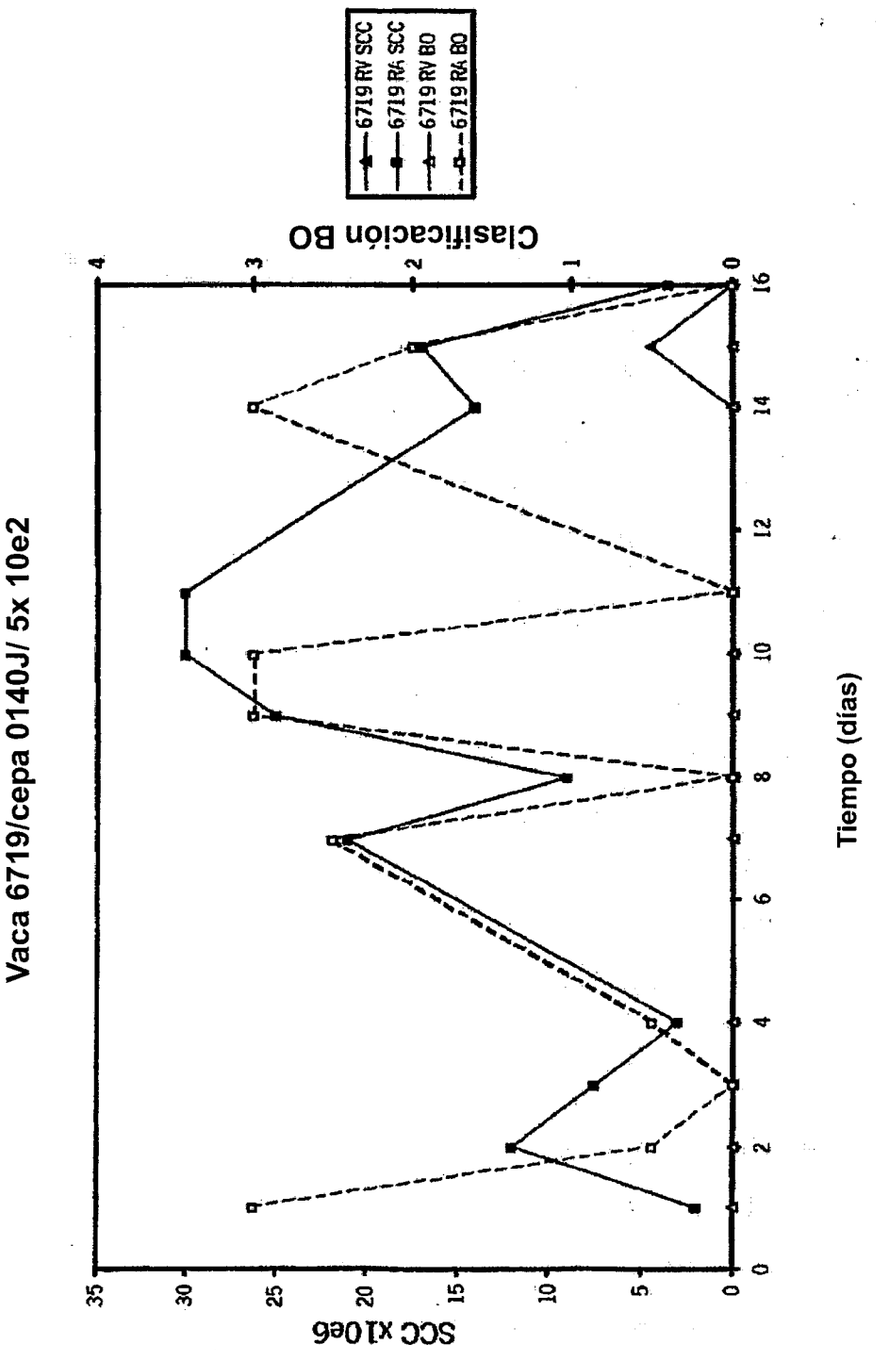

6719 RV SCC
6719 RA SCC
6719 RV BO
6719 RA BO
Clasificación BO
SCC x10e6
Vaca 6719/cepa 0140J/ 5x 10e2
Tiempo (días)

Fig. 3B, Condt.

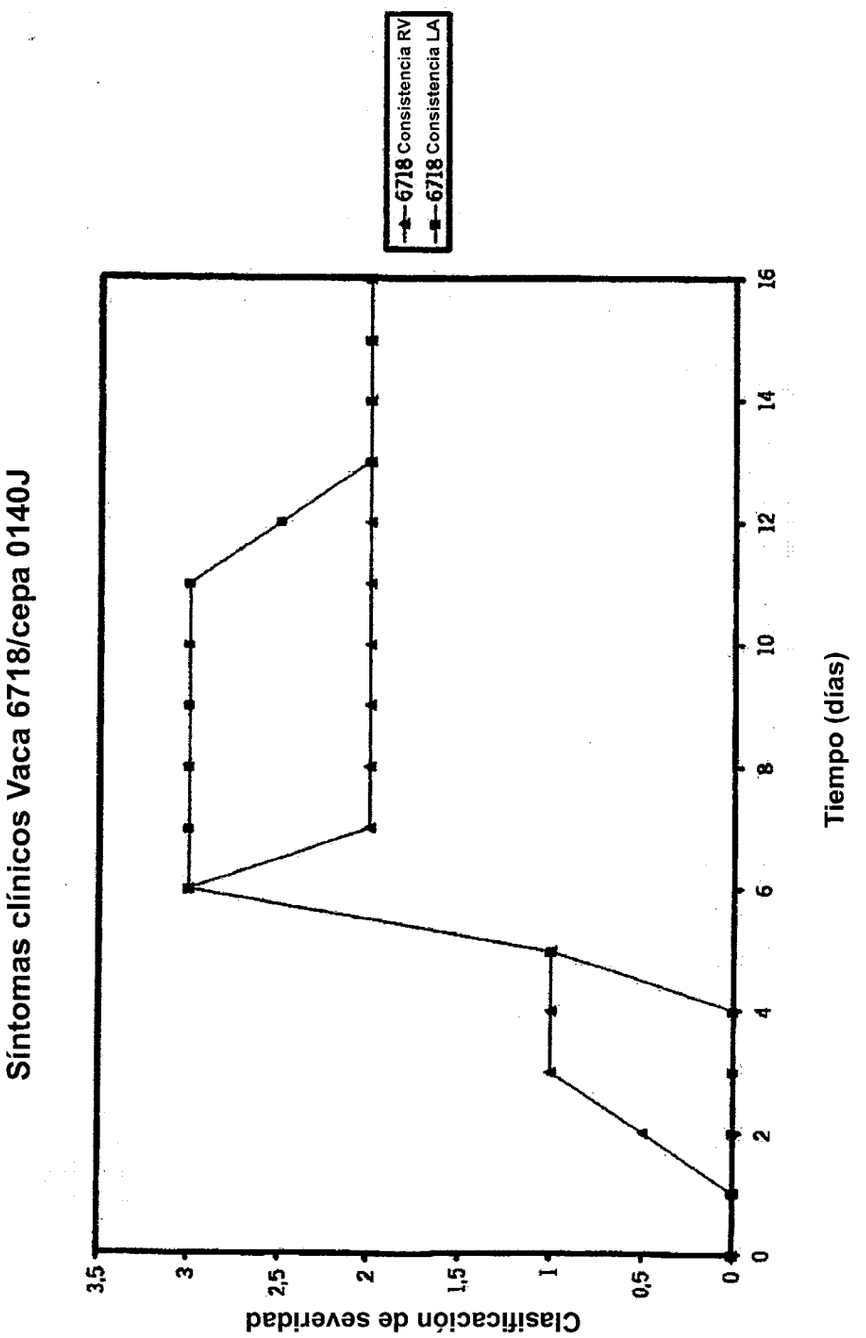

6718 Consistencia RV
6718 Consistencia LA
Síntomas clínicos Vaca 6718/cepa 0140J
Clasificación de severidad
Tiempo (días)
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
0
2
4
6
8
10
12
14
16

Fig. 3B, Condt.

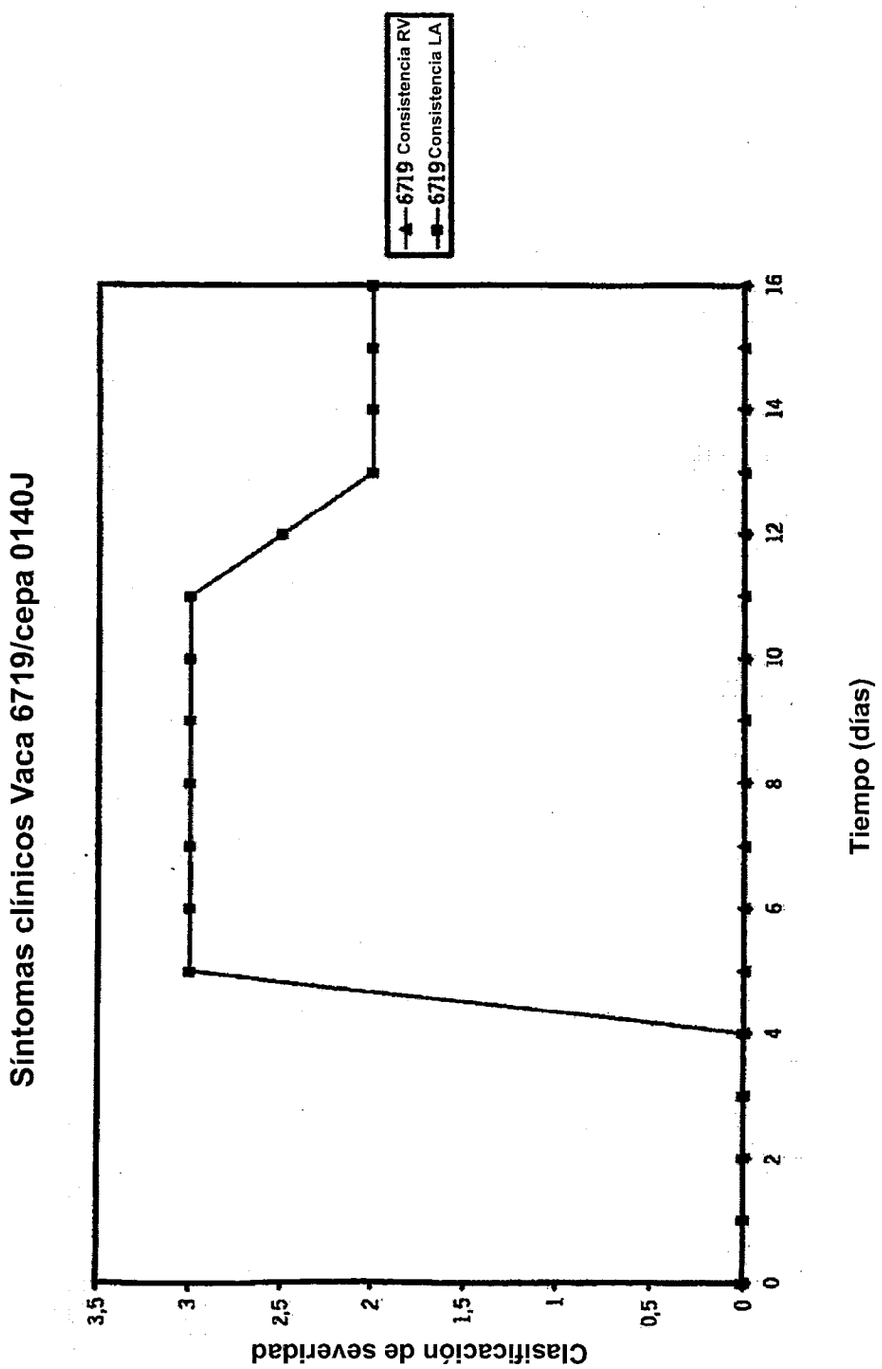

6719 Consistencia RV
6719 Consistencia LA
Síntomas clínicos Vaca 6719/cepa 0140J
Clasificación de severidad
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Tiempo (días)
0
2
4
6
8
10
12
14
16

Fig. 3C

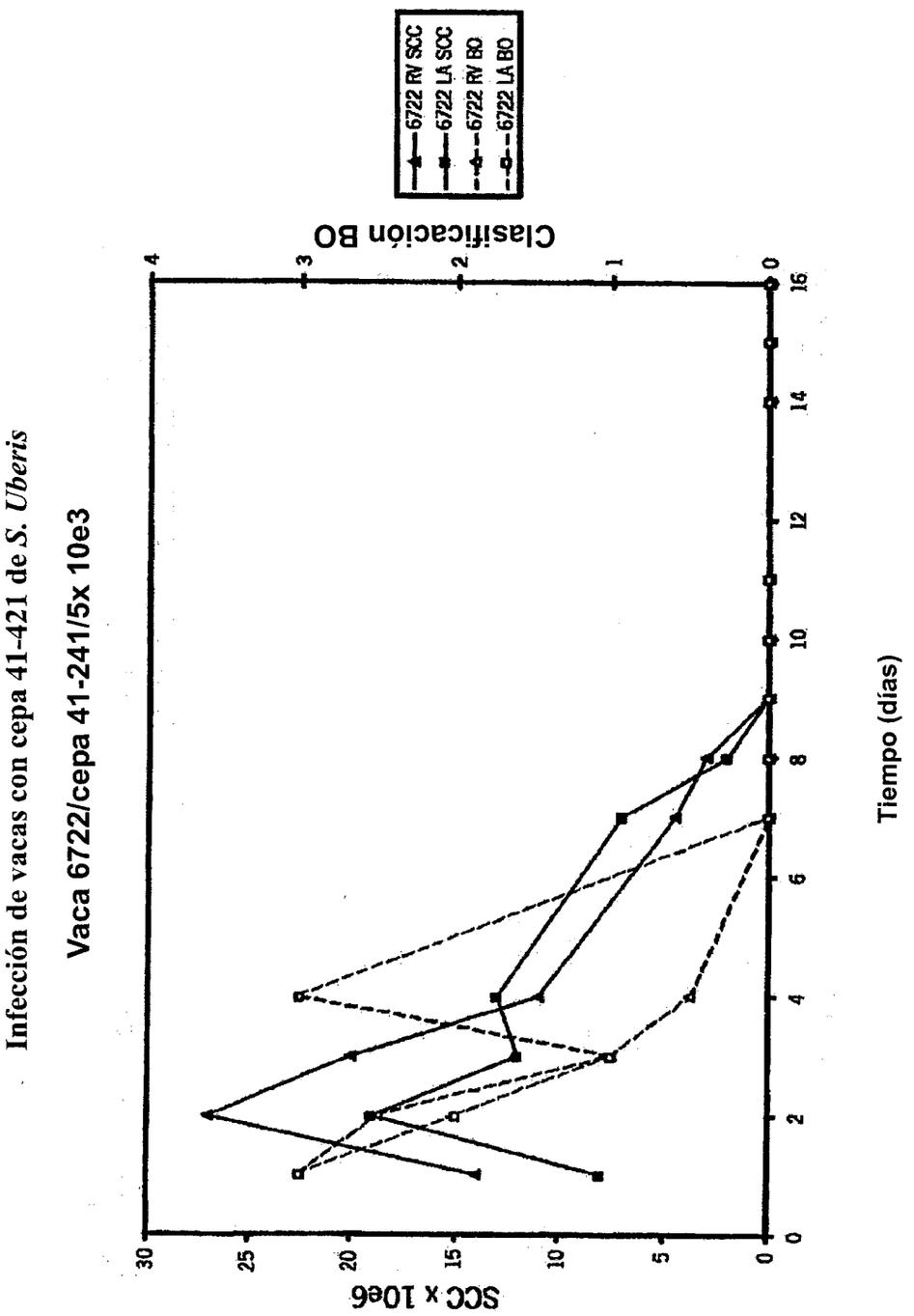

Infección de vacas con cepa 41-421 de S. Uberis
Vaca 6722/cepa 41-241/5x 10e3
6722 RV SCC
6722 LA SCC
6722 RV BO
6722 LA BO
Clasificacion BO
SCC x 10e6
Tiempo (días)

Fig. 3C, Condt.

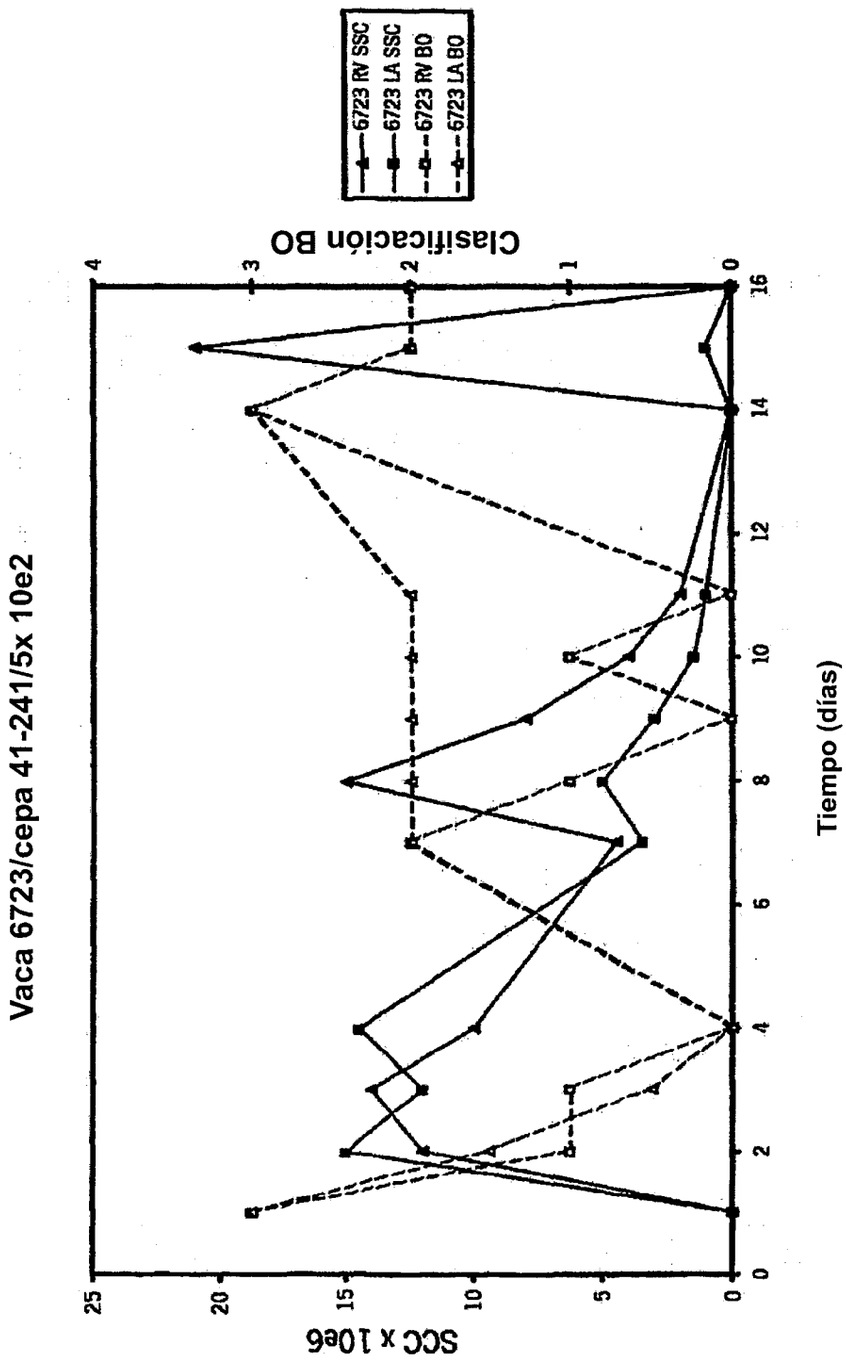

6723 RV SSC
6723 LA SSC
6723 RV BO
6723 LA BO
Clasificacion BO
SCC x 10e6
Vaca 6723/cepa 41-241/5x 10e2
Tiempo (días)

Fig. 3C, Condt.

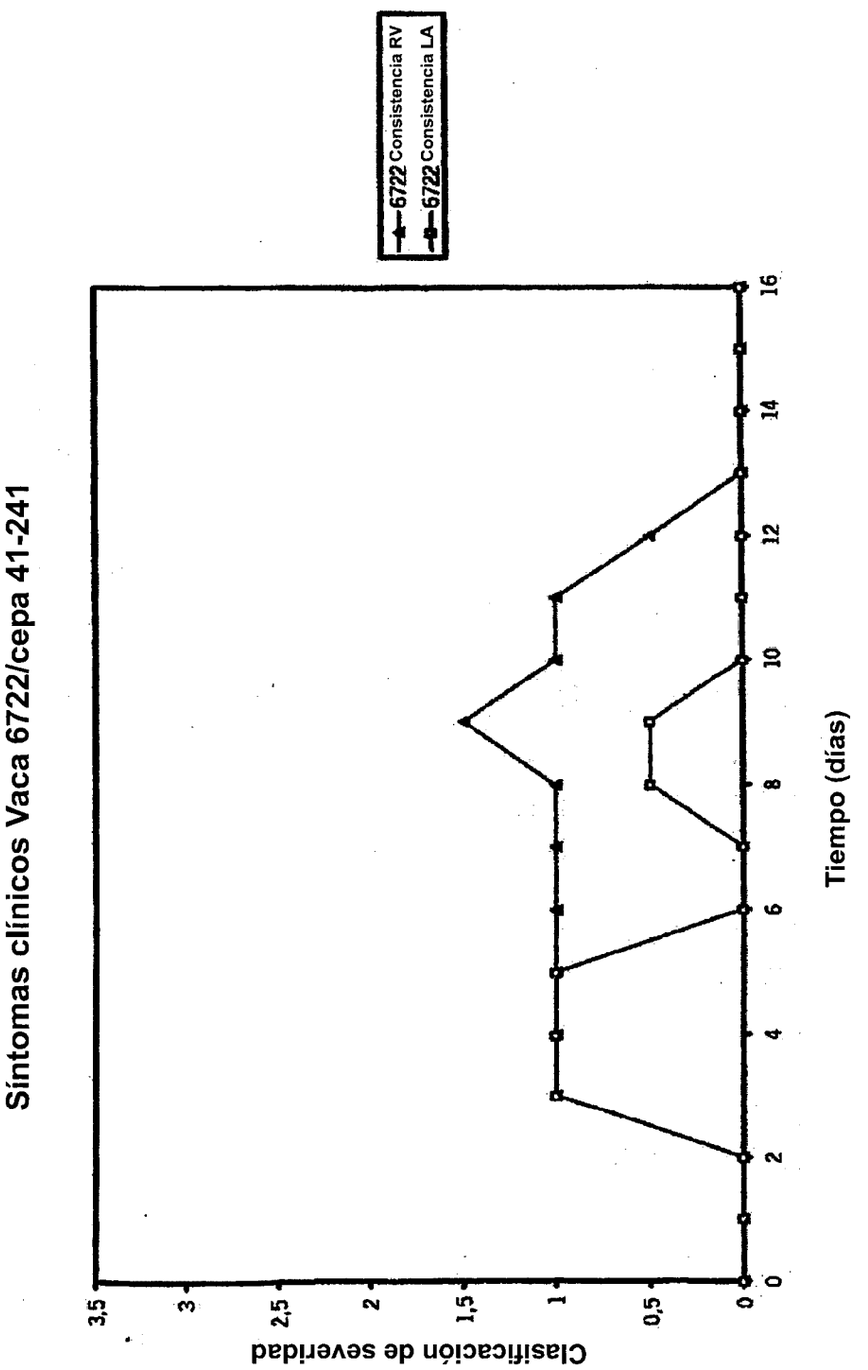

6722 Consistencia RV
6722 Consistencia LA
Síntomas clínicos Vaca 6722/cepa 41-241
Clasificación de severidad
Tiempo (días)
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
0
2
4
6
8
10
12
14
16

Fig. 3C, Condt.

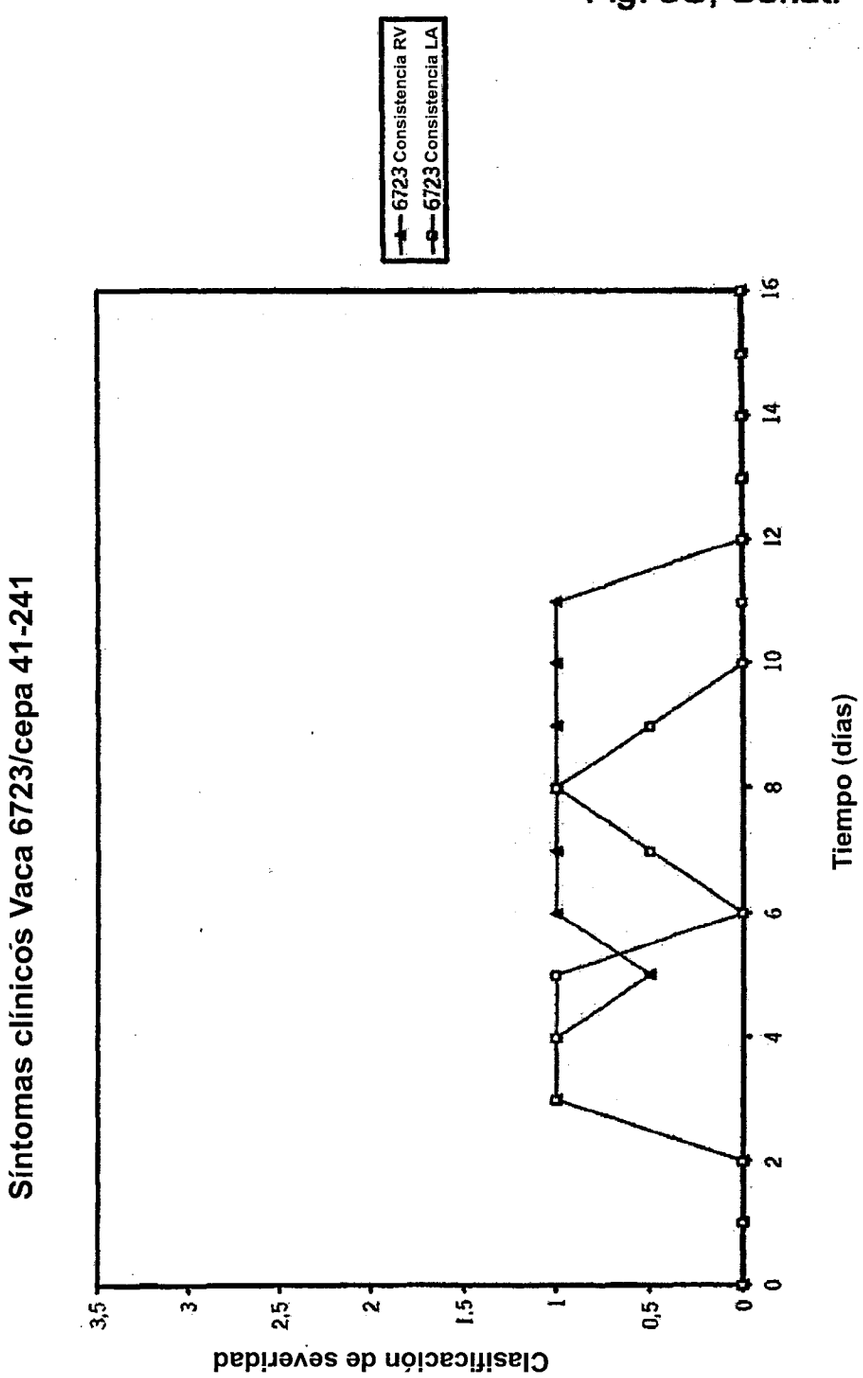

6723 Consistencia RV
6723 Consistencia LA
Síntomas clínicos Vaca 6723/cepa 41-241
Clasificación de severidad
Tiempo (días)
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
0
2
4
6
8
10
12
14
16

Fig. 4

Secuencias de ácido nucléico y secuencias de aminoácido de proteínas S. Uberis de tabla 5

SEQ ID 4

atgactgagaacctaatcggaaatttatcgttattcgaactttcaatcttattattacttattttgttgctgcatattt
tatttatttagcagttcgtgactatcgaaatgccaaaattattcggcaaatgagtcataaaatccgtgacctaatcaatg
gtcgttacacggatgaaatcaatgaaaaagctgatattgagctcattgaactttcagagcaactcaatgatttatcggat
gtctttcgattgacccatgaaaatcttgcccaggaaaaaaatcgcttagccagtattttggcctacatgagtgatggggt
tttggcaacagaccgaactggtcaaatcatgatgattaacgaaaccgcccaaaaacaattgaatatttcgaaagaagaag
ccctttttaatgaatatcacggatttgttagggcaagacactccctatacctaccgggaattggtttccaaaacaccgatt
gttaccttgaatagacgcgatgagactggtgaatttatcaccctcaggctgcgctttgccttgaatagaagagaaagtgg
attcatttcggggcttgttgtcgtcctacatgacactaccgaacaggaaaaagaagaacgtgagcgtcgcctctttgttt
cgaatgttagtcacgaattaagaacgccattgacatcagtcaaatcctatttggaagccctggatgagggtgccttaaaa
gaagatatcgcaccaagtttcatcaaagtttcactagatgaaaccaatcggatgatgcgaatgatttcggacttgttaaa
cctgtctcgtattgataaccaagtcacagctctagcagttgaaatgaccaatttcacagcctttatgacttctatactaa
atcgttttgatttagtgagaaaccaaaatacagtttcagggaaaagctatgaaattatacgagattatcctattacttct
gtttggctagaaattgacaatgataaaatgacacaagtcattgaaaacattttaaataatgctatcaaatattcacctga
tggtggtaaaattcgtgttaagatgaaaacaacagatagtcaattgattatctctatttcggatcaaggattaggaattc
caaagaaagatcttcctttgatttttgaccgattttatcgggtggataaagcacgcagtcgtgcacaaggtggaacaggt
ttaggacttgccattgctaaagaaattgtaaaacaacataatggttttatatgggcaaaaagtgactatggcaaaggctc
gacctttacaattgtattgccatatgaaaaagatgttgttgcaggaacagatgatgaatgggaggatgatattgac

MTENLIGNLSLFELSILLLLIFVAAYFIYLAVRDYRNAKIIRQMSHKIRDLINGRYTDEINEKADI
ELIELSEQLNDLSDVFRLTHENLAQEKNRLASILAYMSDGVLATDRTGQIMMINETAQKQLNI
SKEEALLMNITDLLGQDTPYTYRELVSKTPIVTLNRRDETGEFITLRLRFALNRRESGFISGLVV
VLHDTTEQEKEERERRLFVSNVSHELRTPLTSVKSYLEALDEGALKEDIAPSFIKVSLDETNR
MMRMISDLLNLSRIDNQVTALAVEMTNFTAFMTSILNRFDLVRNQNTVSGKSYEIIRDYPITSV
WLEIDNDKMTQVIENILNNAIKYSPDGGKIRVKMKTTDSQLIISISDQGLGIPKKDLPLIFDRFY
RVDKARSRAQGGTGLGLAIAKEIVKQHNGFIWAKSDYGKGSTFTIVLPYEKDVVAGTDDEWE
DDID

SEQ ID 5

atgaaattcataaaaatcttattatctcaaatcgtcagtctatttttgctcttaacaatcagtttacatgctttagagac
agtcaatgcagctgtactgggggatgactatcccattgcatggaaatccggttggggtacagacacttgggaaatgtacc
gaaggcaatgcacctcatttgttgcttttagattgaatcaagtaaatgggctttcaatcccttctggtttaggaaatgct
gatacttggggtcatattgctagacgaatgggtatcctgttaatgatatcccagcagtaggagccgttgcctggtttga
taaaggaataaatggttctcatcttgcctatggacatgtctcctgggttgcggaggttaatggtaatctagttaccttag
aagaatataattttgatgccggacaaggtcctgaacaatatcatagaagagtcattaacagtcatcaagtcagtggtttt
attcatttcaaagatgtcgatactggaagtattcccatctcttctcctatgcaaagcccgagatcaacaattccaaacca
agggagttatcattttaccgaacagatgcccataaaagctcagcctattgccaatagccaagcaattgccttttaccagg
ccggccaaatggttcactatgataaaaccgtaattgctgatggttatcaatggctatcatacattgcctattctggtcaa
agacgctacatcccaattgctaaggtaacttctaaggaaagttcaaaacaggaggactttgccccaggtgaccaagttac
tttttctggtgtttaccaagtcactcaaattcatggtagcctgctttctagtaaggacttagctggtggagagcctggtc
ctctaaattggttagatccaggtcctgtccttgaaagcaacagagacggacaacaaagtggagatcaaatactctacccc
ggcgatttctttatcattccaggaaactacaaagttttacagattcacaaggaaacaaaaggtctccttattcaaatagg
aaaccgacaaacttgggtatcaatgaacaaggttcagaaatctaca

MKFIKILLSQIVSLFLLLTISLHALETVNAAVLGDDYPIAWKSGWGTDTWGMYRRQCTSFVAF
RLNQVNGLSIPSGLGNADTWGHIARRMGYPVNDIPAVGAVAWFDKGINGSHLAYGHVSWVA
EVNGNLVTLEEYNFDAGQGPEQYHRRVINSHQVSGFIHFKDVDTGSIPISSPMQSPRSTIPNQG
SYHFTEQMPIKAQPIANSQAIAFYQAGQMVHYDKTVIADGYQWLSYIAYSGQRRYIPIAKVTSK
ESSKQEDFAPGDQVTFSGVYQVTQIHGSLLSSKDLAGGEPGPLNWLDPGPVLESNRDGQQSG
DQILYPGDFFIIPGNYKVLQIHKETKGLLIQIGNRQTWVSMNKVQKST

SEQ ID 9

atgactattatcaaaaacatcctggtgaaaataagctgttgccatagtaaagccttcacccttgcggagagtctcctgtg
tctggcagtgacgaccttcaccattctgttgctaagtagctctctggcgggtgtttatgaaagtgtggaaagagaattgt
ttttcatttcctttgaacatttttatcgtcattgtcaaaaaatgagtgttttaaaacaagaagaaagtgctttgcacttt
acagcacatcgtatcaaatatggtcagcgtgaattagtgattccagatcatattcgattgttaaatcaagggactatccc
ttttaacaaaacaggtggtagtcattccttagcaaaaattgagtggcaaacaccaagggagaaattgacataccagctaa
atctagggagtggaaattatcaaaaacgaagacat

MTIIKNILVKISCCHSKAFTLAESLLCLAVTTFTILLLSSSLAGVYESVERELFFISFEHFYRHCQ
KMSVLKQEESALHFTAHRIKYGQRELVIPDHIRLLNQGTIPFNKTGGSHSLAKIEWQTPREKL
TYQLNLGSGNYQKRRH

SEQ ID 11

atgatcaatctaaaggtaaatactgtccctattcaaaaggagaaaggaattatgaagcaagaaaagaaatgtgttaattg
gtttatgcgcaagcgggggaaacaatggatttatggttgtggcattttaatttgtggcttggttttcggagttgaagcta
cttcagtcgctgctgagactattccaacaacagcaacagttgagactttaaattcagatgtaacaagtaagacatctcaa
gaaacacagaagactactgaaatagcaacaccagtttcagaaatagttatgccatctcaacaaaaagttgttgaggaggt
aactcaagaagttagcgtacaaaatcaagagacggtcataaatatgcctgtgttaactcaaggagtaaatatagcaggac
caaatgaaacggctatattaacggattcgattgtccaaaacaatgttcaacctattgatagagttgagaaaatggaaaca
tcctttctaccgaattgactaagaaagctgaaagtagctataatacaaatcttcaagatttgaattatgatccaaatgt
ttgggaagttcgtgaagatggtttgtatagtaacgctgttggaaaaggtgacaatttcctattttcagcatcaactggtg
aaaactttatcttccaaacagacgtaacctttcttcaaaatacggagcagcttcactcgttttccgttcaaacaatgat
cctgaaaatctcaatggttatgttgttaatcttgatggaaattcacacaaagcaaggttatggcgttgggctgaagcaaa
tttaattaatgacaaagaaattctagccagtccggacaataaatatttcttaaaagtagtggcgactaacgggtggattt
catactacattaatggtattttgattgcaaacttgagcgactacactatacaacgtgatgaccttggtcaaacaacatat
attaaagatggtcattttggtcttttgaactggaatggtgaaatggtcttccaaaatacctttctaccgtgaattgacaaa
tgaagagttacctcttcttaatgatgtgacggtaacgtcaaaaaacggtccagttgaacctaaaggacaatttttttcag
agagttcagtttatattcaatatgtatcaaacgatgcctcaacggtggacttgagctttgatgctaataattcagatgca
ctaataacagtgactgatgctcatggtaaagtttattcaaatccaagcgcaattcctgtaactgttggaccaaattatct
cacggtgacaagtacttacacaacaacagatggctacgtaatcccctcaacataccgtattaatgttcaccggcgtcaac
cacagtcagtttattataatgaaaacttccgtgatcaatatcattactctgttaaagatggctgggcaaatgatcctaat
ggattagtttactataatggtgtttatcatatgttttaccaattctacgatgatacaaaatgggggccaatgcattgggc
acatgcaacaagtactgatttgattcattgggaagaccaaccaattgctttttatccagactataatggaacgatgttct
caggctgtatagtggcagatgttaataattctagtggacttttgatagtgaaaatggtggattagtagctctcattacg
attaacggggaagggcaacgcattaaacttgcatatagtactgatgaagggaaaacctggcaaaaagtggatgaaattgt
agcggattggactacagacccactacaaactcgtgattttcgtgaccctaaagttttccgttgggaaaataaatggttta
tggtaattgcaggtggaccactacgtctttattcatcagatgatcttaaaaattggactgtggaatcaacgtatccagat
cttcatacagaatgtccagatctttacccagtcttggcggaagatcagacagtgaaatgggttctttctcgcggtggtcg
ttattacaaagttggtgatttacaacaagctgacggaaattggaaattcataccagatgctaattaccaagaaacagata
gtatcatgaattttggtaaagattcatatgctgcgatgacatactatgtacaagattttggtaccaaagctaatccaact
attccaaagattattgaattgaattggatgaatacttgggataactattgcaaccttgtagctgatcgcttaggtcagtc
atttaatgggacttttaaccttaatttagaacttggtcttgtcaaagaaggtgataagtatgttcttactcagacaccgg
ttgaagcttatgaaagtttacgtgataatgacaacaaagttgaatacaaaaatgttgtcgttggtaaagaaaatgacctt
tttaaagatttttctggagatacttatgaaattgttgctcacttaaaccgagtgacaaaacaacaaaagttggtttcaa
ccttagagttggttcaggggagatgactaaggtttactatgatttgatagcaggacgaatcattatcgaccgaagtcaat
caggcattatattgacggaacttttagtaatattgatagtcaggctgtaacacctaatattgatggaagtattgatcta
cacatttttgttgatcgtgctagtgttgaagtttttcaaaaaatcatacagtagcaggggctaaccaaattttcacatc
agctcaaagtctaggattggaagtactcattgatggtgaagatgctaaagcagatattgtcttatatccattaaagagca
tctggaaaaataaaattattgatacaacacccaaattgttattccagctagtgaaccaaaagtacggatgaatgtgggt
gatagcacaaccgtaaaagcttatgtttcaccagttggggcgagtcaagatcttatttggaatattagcaatccaagtct
agttttagatcaaatatcaggtaatcaggttttttcttaaagcgattaagaaaggacaagttattgtaagagcacagtcac
aatctaatccagcagtttatcaagatttattattgatattttagaagataacttcaatacaaatgttaaagatgtgaat
gtattttctggcgattggtacgttgatggcgaatctttgaaagttgcaaatcacaattcaaacgacatttacatgtcagc
agataagataccatatgaaaattatcaaatggacttggatataaaatatggtcgaggaattgtaaatatcttctttgctt
caggtaatcctgacgctaacaacgcttatactatccaatttggtagcaataattcagttcgtttgttccgcttctacaga
gatactatttttgaggcgccaatgatagatgtgattaatgacaatcaattccaccatgttcgattggtgaaatcagcaaa
tgtcatccatgtttatgttgataatgaaatggtaatgtcttacacatttgatcaagttgaagagtttttcaacaatccat
accttggcctaggtctttgggatggcgaactagctgttcagaacttttatgtaattgatttagatgcgcaaaaacctgtt
tttgttgaagagcatgagaaagagaaactactatcagaattaaaaaaatcagtggttaaaacaagttcatattcaactct
aaaaacaatagagacgtcttcaaaaacaaattctgagaacttagaagctccgactgtttctaagaaaaacttacctatga
caagtgatagtaacaataatttagaggaactgggtatattagtaattctaacgactttaggagcttttttaggacgcgtt
attttaaaaaaagaaaaataa

MKQEKKCVNWFMRKRGKQWIYGCG[illegible]VPGVEATSVAAETIPTIATVETLNSDVTSKTSQ
ETQKTTEIATPVSEIVMPSQQKVVEEVTQEVSVQNQETVINMPVLTQGVNIAGPNETAILTDSI
VQNNVQPIDRVEKMETSFSTELTKKAESSYNTNLQDLNYDPNVWEVREDGLYSNAVGKGDN
FLFSASTGENFIFQTDVTFLQNTGAASLVFRSNNDPENLNGYVVNLDGNSHKARLWRWAEAN
LINDKEILASPDNKYFLKVVATNGWISYYINGILIANLSDYTIQRDDLGQTTYIKDGHFGLLNW
NGEMVFQNTFYRELTNEELPLLNDVTVTSKNGPVEPKGQFFSESSVYIQYVSNDASTVDLSFD
ANNSDALITVTDAHGKVYSNPSAIPVTVGPNYLTVTSTYTTTDGYVIPSTYRINVHRRQPQSVY
YNENFRDQYHYSVKDGWANDPNGLVYYNGVYHMFYQFYDDTKWGPMHWAHATSTDLIHW
EDQPIAFVPDYNGTMFSGCIVADVNNSSGLFDSENGGLVALITINGEGQRIKLAYSTDEGKTW
QKVDEIVADWTTDPLQTRDFRDPKVFRWENKWFMVIAGGPLRLYSSDDLKNWTVESTYPDL
HTECPDLYPVLAEDQTVKWVLSRGGRYYKVGDLQQADGNWKFIPDANYQETDSIMNFGKDS
YAAMTYYVQDFGTKANPTIPKIIELNWMNTWDNYCNLVADRLGQSFNGTFNLNLELGLVKE
GDKYVLTQTPVEAYESLRDNDNKVEYKNVVVGKENDLFKDFSGDTYEIVAHFKPSDKTTKVG
FNLRVGSGEMTKVYYDLIAGRIIIDRSQSGIILTELFSNIDSQAVTPNIDGSIDLHIFVDRASVEV
FSKNHTVAGANQIFTSAQSLGLEVLIDGEDAKADIVLYPLKSIWKNKIIDTTPQIVIPASEPKVR
MNVGDSTTVKAYVSPVGASQDLIWNISNPSLVLDQISGNQVFLKAIKKGQVIVRAQSQSNPAV
YQDFIIDILEDNFNTNVKDVNVFSGDWYVDGESLKVANHNSNDIYMSADKIPYENYQMDLDI
KYGRGIVNIFFASGNPDANNAYTIQFGSNNSVRLFRFYRDTIFEAPMIDVINDNQFHHVRLVKS
ANVIHVYVDNEMVMSYTFDQVEEFFNNPYLGLGLWDGELAVQNFYVIDLDAQKPVFVEEHE
KEKLLSELKKSVVKTSSYSTLKTIETSSKTNSENLEAPTVSKKNLPMTSDSNNNLEELGILVIL
TTLGAFLGRVILKKEK

SEQ ID 12

atggctgaacttgaaacacaaaaaactcagttaacttctgcggttaatactacaaaatctcaattagaccaagctaagca
agtattgagtaacttacaagcaacacctcttcaaactcaaaatgctcaatctaaacttgatcaagcgaaagtagagttag
cacttgcacaagataactatgttaaagcccaagaagctgttaaattagctagtcaagaattagttgtcaaagaagctaac
ctaaaaaatgcccaagccgacctattagataagcaaaatattttgaatgaagcacaagcaacccttgcagaaagtcaatt
agtattagctagtttacaatctaaccttaaagaagcacaagcaagtttggcagaagctaaaacatcgttagataccgcta
aaacaaatcttgcacagaaacaagcatacttactttctcttcaaaatgcgcctaaagttctagcagaagctcaagctaaa
cttgttactgctaaaagtgatttagccaaaaaaatggctattttagacaaagaagtagccaaattaaaagaattacaagc
tgttcaagctgaagctcaaaaccaatatagtattgtttttgaagcttttaaagcagtacaagaagctaagaaacaagctg
aattaacagaaatctatgagcatattatctcagaaggaggagaagcaataccagttgttgacgaaacaggtaaaataact
ggttatgtagatggtagtaagaaaattgttactaatgaaacgagttttgagctaattagtacagataaatcacctgttga
atcaccagtcaatcaggaaaacaaattagtaagttcttcaactaatgatttaccgaatactggtgaatcaagcattgcac
cattcacagcaattggagcaattatcttatcagttcttggactattagggtttaaaaaacgtcgtacttat

MAELETQKTQLTSAVNTTKSQLDQAKQVLSNLQATPLQTQNAQSKLDQAKVELALAQDNYV
KAQEAVKLASQELVVKEANLKNAQADLLDKQNILNEAQATLAESQLVLASLQSNLKEAQASL
AEAKTSLDTAKTNLAQKQAYLLSLQNAPKVLAEAQAKLVTAKSDLAKKMAILDKEVAKLKEL
QAVQAEAQNQYSIVFEAFKAVQEAKKQAELTEIYEHIISEGGEAIPVVDETGKITGYVDGSKKI
VTNETSFELISTDKSPVESPVNQENKLVSSSTNDLPNTGESSIAPFTAIGAIILSVLGLLGFKKR
RTY

SEQ ID 14

atgacacacatgaataaaaacggacgctacaagcaacgctttagcctccgcaagtacaaatttggtgcagcttccgtcct
cctaggaaccatcttcgccctaggcatgaccggaacaacagcacaggctcaggaaggatgggctggaagtggtctaggag
tacctggcgttggagtacctggcgttggagtacctggcgttggagtacctggcgttggagtacccggagtaggtgtacca
ggtgtaggagtcccaggcgtaggtgtacctggtgtaggagtcccaggcgtaggcgtaccaggagtaggagtaccaagtgg
ttataataatggctttgattatggaacaggttatggttcagggtacgggaatttaggttatcctatgcccgtacctgtac
caggacctatgggccctccgggaatgccaggattgcctggaccagcaggtccgtcaggaccagttggaagaacaggtgag
gctggacaacctggaccagcaggtgctcgcggagagcaaggaccagcaggaccaagaggtgaggctggtgcaactggacc
aagaggtgaagcaggtcctcaaggtaaggaaggaccggcaggaccagcaggtgcaaaaggtgaacaaggtccccgtggtc
aaaaaggtgaaaaaggtgatcgcggacgtgatggattacaaggtttacaaggaaagccaggtaaagatggccgtgatgga
caaaaagggagaaaaaggtgatccaggtaaaaatggtaagcaaggccctgcaggacgtgatggcttgaatggtcaaaaagg
tgacccaggtaagaacggtctaaatggtaaaccaggtgctaaaggtgctgatggtcaagatggtcgcgatggtcgtgacg
gtaacccaggtaaaccaggtaagaacggtgctaaaggaacaccaggtcgtgacggtgctaaaggccgtgatggtaaagac
ggtaccaatggtgtagccggtaaaaatggtcgtgacggtgccaaaggccgtgatggtaaagatggcgctaaaggtcaaga
cggtaaacacggtcgcaacggtcaagatggcagacatggacaagacggtgtcgatggccgtaatggtctagatggtcgcc
gtggtcgtgacggacgtgatggtcgtgatggtatcgacggtgtcgatggtcgtgacggtttatcaccaatcattaaaacc
atgacacactctgatggaagccatactatccacttcctcaacccagatggcacacgttcagaaatcacccttcgtgatgg
taagaacggtcaagatggaaaagatggcgctccaggtcgtgacggtgtagacggtaaagacggtgcaccaggacgtgatg
gccgtgatggtaaagacggtatgccaggtcgtgacggacgtgacggtcacgatggcaaagacggcatgccaggacgcgat
ggcatgaacggtaaagatggtcaagcagcagcaggcaacactgctggcaaaggcaatgcttcagacatgaaacctaaagc
tatggcagcacctgcagcaatgactaaccaaaacgctcatgcaaataacaaaggtccagctacagcgcaattgccatcaa
ctggtgacaaggctaacccattcttcacaaccgcagccctagcagtcatggcttcagcaggaatggtagctgtatcacgc
aaacgcaaagaagat

MTHMNKNGRYKQRFSLRKYKFGAASVLLGTIFALGMTGTTAQAQEGWAGSGLGVPGVGVPG
VGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGVPSGYNNGFDYGTGYGSGY
GNLGYPMPVPVPGPMGPPGMPGLPGPAGPSGPVGRTGEAGQPGPAGARGEQGPAGPRGEAG
ATGPRGEAGPQGKEGPAGPAGAKGEQGPRGQKGEKGDRGRDGLQGLQGKPGKDGRDGQKG
EKGDPGKNGKQGPAGRDGLNGQKGDPGKNGLNGKPGAKGADGQDGRDGRDGNPGKPGKN
GAKGTPGRDGAKGRDGKDGTNGVAGKNGRDGAKGRDGKDGAKGQDGKHGRNGQDGRHGQ
DGVDGRNGLDGRRGRDGRDGRDGIDGVDGRDGLSPIIKTMTHSDGSHTIHFLNPDGTRSEITL
RDGKNGQDGKDGAPGRDGVDGKDGAPGRDGRDGKDGMPGRDGRDGHDGKDGMPGRDGM
NGKDGQAAAGNTAGKGNASDMKPKAMAAPAAMTNQNAHANNKGPATAQLPSTGDKANPFF
TTAALAVMASAGMVAVSRKRKED

SEQ ID 15

atgaaaaagcatattgtgttaaaaagcagtattttaggtcttgtcgctggaatgtcagttttagtatcatctgtacaagc
tgatcaagttgatgttcaaattttaggagttaatgatttccacggtgcactggatcaaactggttcagcttat
atgcctgatggaaaagtgtctggggctgggacagcggctcaattagatgcatacatggatcaagcgcaagcagattttaa
ccaaactagtccaactggaacaagtatccgtgtacaagctggtgatatggtcggtgcaagtcctgcaaattctggattac
tacaagatgagcctacagtccaagtatttaatgaaatgggcgttgaatacggaacactaggaaaccatgaatttgatgaa
ggattagctgagtataaccgtattatgactggcactgcacctgcagctgattcaagcatcaaccaaattacaaaagatta
tacacacattccatcggaccaaacaattgttatcgctaacgtggttgataaaacaactggagagattccgtataactggc
aaccatatgctataaaaaatattcctgtaaacaacacttctgtgaatatcggttttattggagttgttacaacagaaatt
ccaaatctcgtcttaaaacaaaactatgagcaatacaatttcttagacgaagcggaaactattgccaaatatgccaaaga
attacaaggacaaaatgttaatgccttagttgtattagctcatattcctgcaacaagtggtaaagatggtatagtaggcg
acgaaatcgctacaataatggataaggttaaccaattatatcctgacaatagcattgatattatttttgcaggtcataat
caccagtatacaaatggaaccatcggttctactcgaattgttgaagcactatcccagggtaaagcatacgctgatgtgcg
tggtacacttgacactgatacacaagactttatagctacccctactgctcaagttgttgcagttgcacctggcgttttaa
caggcacagctgaaatccaagctattgttgatgaagctaatacaattgttaaacaagtgactgatcaaaaaatcggaact
gccgcaagttcagaattaatttcacgtgaagtaaatgtagataaagaatctgcagtaggaaatctcatcacaactgcaca
attgacagttgctcgtgaaacatatcctgatgttgattttgctattacaaataacggaggaatccgagcagatttactag
taagtagtgatcaaagcattacttggggtgctgctcaagcagttcaacctttggaaatatcctacaaatagttgagcta
actggtcaagaaatatacgatgccttaaatgaacagtatgatgagggcaaaaatacttcctccaaatgtcaggcttacg
ctatgcatacactgatagtggctcaactgaccctcttgttccatttaaagttgtgaaagcttacaaagacaatggagaag
aaatcgatccaaatgctacttataaattagtcattaatgacttcctatatggtggtggtgatggttttgcaacattcaaa
aaagggaaattattaggagcaattaatcctgatactgaggtctttattaaatatatcaaagacttagaagctgctggcaa
accagtaacagctgcaataacaggggttaaaacctatgttacaacggcccttgagccttcaacaactactgatgcaagtg
gtactcatgaaatgatcaatcgtgtttaccgtgatcgtgatggaaaaattgtggctacagaagtcgtttccgacctcttc
actccagctcctgttgaagaaactgaaacacctaaaccagctgttaactctattaagattcctgttaaaacaccaaaata
tggtcaaagcttaacagcagtaaaagcaggtcagcaagcacaaaaagcaagtgacaaaaaacaattgccaactacttcaa
gtcaagaagacacagcaattctactttcattacttggtgcatcaagtctagcaatggcggtagcattaaagaaaaaagaa
aataac

MKKHIVLKSSILGLVAGMSVLVSSVQADQVDVQILGVNDFHGALDQTGSAYMPDGKVSGAGT
AAQLDAYMDQAQADFNQTSPTGTSIRVQAGDMVGASPANSGLLQDEPTVQVFNEMGVEYGT
LGNHEFDEGLAEYNRIMTGTAPAADSSINQITKDYTHIPSDQTIVIANVVDKTTGEIPYNWQPY
AIKNIPVNNTSVNIGFIGVVTTEIPNLVLKQNYEQYNFLDEAETIAKYAKELQGQNVNALVVLA
HIPATSGKDGIVGDEIATIMDKVNQLYPDNSIDIIFAGHNHQYTNGTIGSTRIVEALSQGKAYAD
VRGTLDTDTQDFIATPTAQVVAVAPGVLTGTAEIQAIVDEANTIVKQVTDQKIGTAASSELISRE
VNVDKESAVGNLITTAQLTVARETYPDVDFAITNNGGIRADLLVSSDQSITWGAAQAVQPFGNI
LQIVELTGQEIYDALNEQYDEGQKYFLQMSGLRYAYTDSGSTDPLVPFKVVKAYKDNGEEIDP
NATYKLVINDFLYGGGDGFATFKKGKLLGAINPDTEVFIKYIKDLEAAGKPVTAAITGVKTYVT
TALEPSTTTDASGTHEMINRVYRDRDGKIVATEVVSDLFTPAPVEETETPKPAVNSIKIPVKTP
KYGQSLTAVKAGQQAQKASDKKQLPTTSSQEDTAILLSLLGASSLAMAVALKKKENN

SEQ ID 16

atgaagaagaaacaagaaatgaagtactacctcaggaaatctgcctatggcttagcagccgtatcagtagcagtcctcgc
agtcggaagtccggtatctgcacaggagaaagctgcaagcaccgaagctaccccaaaggtagcaccaaaagttccagaaa
aaccaagtaaagaagttataaaaaaaagctttaaagaaaactgatgaagaaacaaaagaaaaagagaaagaagccaaagaa
aaagtagaaaattctgaagaatcaacggctatggtttcagagctatcttccaccaatgaggaaacatcctctgaagaaga
gaataatactgatgaagaggaaacagatggtttagaaagtgaagaatctgaagaaacagaatccgaagtcaaagaagaat
ctgaagaagaaaaagaggatgacccatccgaatcagatacagaagttgagaatgttgaagcgattaatctttctgaagct
gagggaaatgactcatcaaaacctgaaacttcagaagaggtaactgctgaagaagaccgtcaagagactgatcggcttgc
agaagtcaaaacagaggagagtgccaaagaaggtgatgaagatgctgataaaaaagatgaggctgaagaaaaagccaaaa
aaggagctgaattaagccgtgtgaaagcagaagcactggctaaattagaagcacttaatgctagtcgtttgatgaagaaa
attgttgaatcgggcaaaacggtagaaggcatcctttccttcatgaaggaaagcttacctcaactggaagctgctagagc
atctgaacaagctaaagctccggaagtaactcaatctcctgatcacttaccaagtgagaaaaaagcagtccacaatccag
tccaagtagctaaaagaagtgaaagcttggaacagaaagctgaaaatgctaagacaagcacaaatcttcaaaatactcaa
attccagtacaagaggcaaaaagaactcaagcccaattgccaagtacaggagaagattaccaagcttatcttgtggccgc
agcaatggcccttattgcctcatcaggcatggtggcctatggcagctatcgcaagaaaaagcaaaaatag

MKKKQEMKYYLRKSAYGLAAVSVAVLAVGSPVSAQEKAASTEATPKVAPKVPEKPSKEVIKK
ALKKTDEETKEKEKEAKEKVENSEESTAMVSELSSTNEETSSEEENNTDEEETDGLESEESE
ETESEVKEESEEEKEDDPSESDTEVENVEAINLSEAEGNDSSKPETSEEVTAEEDRQETDRLA
EVKTEESAKEGDEDADKKDEAEEKAKKGAELSRVKAEALAKLEALNASRLMKKIVESGKTVE
GILSFMKESLPQLEAARASEQAKAPEVTQSPDHLPSEKKAVHNPVQVAKRSESLEQKAENAK
TSTNLQNTQIPVQEAKRTQAQLPSTGEDYQAYLVAAAMALIASSGMVAYGSYRKKKQK

SEQ ID 17

atgactaaaaatcgttctagtcattctacctatgctgataaagtgattaaaggactatcagcttcatgcttcatattagg
cgcattcgtttttgcacaacaggttagtgcagaagaagtggtaactgctacaaacacgtctttaactgcaccaaccgtta
caacagtttcaccgctgacaaatacggatgtttctgctactgcggtcgctgcagattccattgcaagcccagtaacgact
acagatagtaatctcaattcagctccaattatagatacaagcaatccatctaatataactagtccaacagataccaacac
ttcaacaacttcatctgacacgacttcatcacctatccccgtaaccttaaataaagcagcaattgctagcccaacaagtc
aaacggaaaccctagcaagccaagaaatttacatggataaggtcaatcaagtgaccataaatacaacagtaaatccagca
actccaatgacctggacgattgaaaattatcctaatcaaacctataatatgcaaaccggtgattttactggatctccaag
ttatacagttacatcaactagtccaaataatagtagtgttcaaattgaaattccgccacttttttggaacagatttaagtc
tacgttggccaaacaatatcagacgtacttaccgtgattatatgggttcctatacacttaaagggatcagtgaagatggt
cttaccattgtcaccaaagaattgattctacgaccttatgctgattacatgacacatgaggaactgctaaatgaattaaa
tgctattgaagctaatcatgcaacagaccgtttggtaacaatagaaacaatcggtcaaagtgctttaggaaatgctatta
aaatgggaattgtagctaaagatcaagctagcttagatacctatttaaatcaaacaaccccaatgatgttgatggatcct
gaccaagcattgaatctcttagcacaaggaaaatttgattataaactccctatcttaatcaataataccatgcggatga
acagccaggaattgatgttgttcgcggtcttttcaaaactttgcaacagagtcagttatcaactatcaaactgttgatg
ccgctaataatccaacaacagtacaaattgatatcaaagctctcttagacaaagtcatcctacttttcaacttcacagaa
aatcctgatggagacattgccaatacacgcgcccttaataacggattagatccaaaccgggatactggctatcaaaccaa
tccagaaacccgtgccattgttgaacaaattaataagtggaatcctatttcaatttttgacgtgcatggctttgttaaag
aattcttgattgaaccatgtacaccaccacatgatcctaactttgagtatgatttatttgatgcaagtctcgttgaaggt
gcacgagaaatgggaaatgccggcatcacaaactctgtttacgacagctacatcataccaaaatttgattatggttcagg
atgggatgactccttctcaggatacacagctgtttatggattgtatcaaggtatcttaggacataccattgaaattccag
aaaccaaccaagaatcctataatgcgggctacttcgcagtcttagcaggtattaattatgacttggcaaatagtgaccag
ctaatgaaaaataagttaaccttcttttctcgtggtatccacaaagcagaagtggctgccgctgaagaagcattgcttac
agtagacggctccgtgaaaggtagaattaaagatggtcacgatacctttcttcccagattattatatgattccaatgacat
tatcaactgaaagtgatactgaccaagctttcaagatgattgattatttcagaagaaatggggtcattttaaatgaatta
acagcggatgttgctggttatcataaaggtgatttagtcattgacatggcacaagctaaaagaggatttgctaaccatgt
tctctacaaaggagcaaatgaatctgaatggccagctatgtatgcagaattagtgatgaatttccctgcaatgcgtggct
ttaaagcagatgccatttacgctgatagtttatttgctggaaatcttggagcagttactttaacaagtgccccaagaacc
gcgcctagtgataaagaatactatattgtttcaaataattcacttgcagcagtccaagctgtcaatgctgctatccgtgc
aggaaaaaatgtttatttgaccaatgatggatatgttatggataaagccacttatgaaagtgtcattggtacatacccat
tatttgctcaagcaacctgtatgaaaccagttggtgacactttgaaagctatcaaagtatatgcacctggaaacccaaac
ctctatttaggatttaattcaccatcagaagtcagtcttgctctaaatcaaatgggatttgatgtggttccttcagtaga
tcaggctgatgtcatcgtgttagacaatgatcaatttgacgcaagtattttaggtaaaaaacctgtcatcattttaggtg
gctctgcaatggctaagttagaaagtttgggtatcttgacaggttttgatgctgccatgactagcgaaagcgatggatca
agttatgaaggacttatgaaaatctctctagatgccaatagtccttacacgagtggctatgcagcaaattctttatacta
ttctaactcaggttcttggattgaaggagtcccaacaggatttatgacactagccaatatttctgcaagtgatttctatg
tttcaggatggtggccaaatcatgaaggattagctaataaaacagttgctattagtggtctttatcagggacaaccaatg
tttatcttcgctggaaatccagtgaataagactcataccattaatttctaccgttgggtgagtaatgctatttttggaac
aaacttaaccagcttcattgaaggtcaatgtactattccaactgactctgaaacacaagttgtaagggttaaccataatg
gtcaaacagtggcagtttatcaacaagtggctaataaggaagttaatgggacagttagtcaaaatagcttgccagcatta
gctgatggcagtcacaaagatgacagcaaactcttctgggtaactggattattggttgcaagtgggggattatttgcagc
tcttaaacgccgtgaggaagac

MTKNRSSHSTYADKVIKGLSASCFILG[illegible]VSPLINIDV
SATAVAADSIASPVTTTDSNLNSAPIIDTSNPSNITSPTDTNTSTTSSDTTSSPIPVTLNKAAIASP
TSQTETLASQEIYMDKVNQVTINTTVNPATPMTWTIENYPNQTYNMQTGDFTGSPSYTVTSTS
PNNSSVQIEIPPLFGTDLSLRWPNNIRRTYRDYMGSYTLKGISEDGLTIVTKELILRPYADYMT
HEELLNELNAIEANHATDRLVTIETIGQSALGNAIIKMGIVAKDQASLDTYLNQTTPMMLMDP
DQALNLLAQGKFDYKLPILINNTHADEQPGIDVVRGLFKTFATESVINYQTVDAANNPTTVQI
DIKALLDKVILLFNFTENPDGDIANTRALNNGLDPNRDTGYQTNPETRAIVEQINKWNPISIFD
VHGFVKEFLIEPCTPPHDPNFEYDLFDASLVEGAREMGNAGITNSVYDSYIIPKFDYGSGWDD
SFSGYTAVYGLYQGILGHTIEIPETNQESYNAGYFAVLAGINYDLANSDQLMKNKLTFFSRGIH
KAEVAAAEEALLTVDGSVKGRIKDGHDTFFPDYYMIPMTLSTESDTDQAFKMIDYFRRNGVIL
NELTADVAGYHKGDLVIDMAQAKRGFANHVLYKGANESEWPAMYAELVMNFPAMRGFKAD
AIYADSLFAGNLGAVTLTSAPRTAPSDKEYYIVSNNSLAAVQAVNAAIRAGKNVYLTNDGYVM
DKATYESVIGTYPLFAQATCMKPVGDTLKAIKVYAPGNPNLYLGFNSPSEVSLALNQMGFDVV
PSVDQADVIVLDNDQFDASILGKKPVIILGGSAMAKLESLGILTGFDAAMTSESDGSSYEGLMK
ISLDANSPYTSGYAANSLYYSNSGSWIEGVPTGFMTLANISASDFYVSGWWPNHEGLANKTVA
ISGLYQGQPMFIFAGNPVNKTHTINFYRWVSNAIFGTNLTSFIEGQCTIPTDSETQVVRVNHNG
QTVAVYQQVANKEVNGTVSQNSLPALADGSHKDDSKLFWVTGLLVASGGLFAALKRREED

SEQ ID 18

atgaaatcttatttgaaacgtcgttacggtctaatcacaacttctgttcttgccgcaactgtattagctactggttggca
aagcacttctgttttggctgaaaatcccacaacatccccaacaaccaccgtcactagtaatggttttaactttaatgcaa
ctcttctagatcacaatggcaaaacagtttccgggaaaacagttagtctctatgatattactgatggtaacagaactttg
gtgcagagtgccgtctctgaccaaaatggtatcgcatcattttcccagttgccactcaaccgaaatctatccgtttttgt
agataatgtcgctcaaggctacacaacacgtactagtgaaagtggacaagtacgctcctctgccttttatattgatggac
agggaacaaacacaccaaaatacagtgataagacaatcactattagtgtcctaaatgaggaagctgagccacttgccaat
caaaaagtaaccttaaccaatcccctaaaagaggttgttggcgaagcaatgactgatgcagatggtcatgttgttttcaa
ggataaacttttagaaggtgtctttacaactatgctgtcaacggaaaagcaattgattctgctcagccagattcaaaaa
gaagtgtctttttagagtccaatcaactagctaaagaaggatttactttcacagcaactattttaggaaaaaacggcaaa
actgtcgctggtaaaaccgtaagtctttatgacattactgatggtaacagaactttggtgcagagtgccgtctctgatca
aaatggtatcgcatcattttctcagttaccactcaaccgaaatctatccgtgtttattgatgatgtggctcaaggctaca
ccactcgtaccagtgaaaatggacaagtgcgttcatctgccttctatgtcgatggacagggaacaaacacaccaaaatac
agtgacaaaaccattacgattagcgttcttaatgaggaaggtgaacctctagctaaccaaaaagttaccttgatcaaccc
cctaaaagaagttattggtgaagcaaatacagatgcaaatgggaaagtcatcttcacagacaagctattagatggtgtct
tttacacctatgctgtaaatgatcaaacaattgatgctactcaaccagatacaagccgtaatgtctttttaagagctgat
caaatcctgaaggaaagccctaaaaatacagcaagcgaggctgctactaatttggaaaaaaccactgaaagcaaagaagg
taacatgcctcagcaaaaccaatcagaagcaaaagaaaaggctcctgaaaaacaagtcgatgctaatgctgccaacaaaa
aagcgccaggtcatggagaagccaaaaaaggcctaccaatggctggagaaagaggaagtcgcttgttcacctttattgga
ctttcacttattttaggaatagccggttacttattgaaacataaaaaagtcaaatcc

MKSYLKRRYGLITTSVLAATVLATGWQSTSVLAENPTTSPTTTVTSNGFNFNATLLDHNGKTV
SGKTVSLYDITDGNRTLVQSAVSDQNGIASFSQLPLNRNLSVFVDNVAQGYTTRTSESGQVRSS
AFYIDGQGTNTPKYSDKTITISVLNEEAEPLANQKVTLTNPLKEVVGEAMTDADGHVVFKDKL
LEGVFYNYAVNGKAIDSAQPDSKRSVFLESNQLAKEGFTFTATILGKNGKTVAGKTVSLYDIT
DGNRTLVQSAVSDQNGIASFSQLPLNRNLSVFIDDVAQGYTTRTSENGQVRSSAFYVDGQGTN
TPKYSDKTITISVLNEEGEPLANQKVTLINPLKEVIGEANTDANGKVIFTDKLLDGVFYTYAVN
DQTIDATQPDTSRNVFLRADQILKESPKNTASEAATNLEKTTESKEGNMPQQNQSEAKEKAP
EKQVDANAANKKAPGHGEAKKGLPMAGERGSRLFTFIGLSLILGIAGYLLKHKKVKS

SEQ ID 19

atgtctaagccaatgacaaagaaaaaaaaggctatttctattcaaaagtctgtaaaaccaattttaggttttaccttcggagccctattatta
tcaactgtttttacaccttccgtatttgctgaagaagtagtgtcttcattagggcacgcaacaagtggtttgctgtctgtatcagttcccaaaga
attaaccagtcttgagacaacgacctacttaatggcaagtgagtctccaagtaacactctaacttcggataccatttctagtgataatggagg
gacggcttcaaatccaaatgaaatagtaaccacagagacaaccagcgaggcgattcctttcgacacagaagtcattcaaaatccggattta
cctataggtgagattaaggtagttcaagaaggagtagctggtgaagtaacggttacaaagacaaccacaactattactctaaatggtgttt
ctcagtcaactacaactgagtcaagggtacctgtcaaaaaacctattaataaaattattgaagtaggtacaaaagagattagtacaagtcc
aagtagttctgatgttattacagtcagtccatcaccctcttcaacttcatcagagtctaatcagcaaggttcgttaactccggcccctaaatcac
gtcaaaatagtcaggaaaagaaaggtagtcagactaaaaaatccaaagatgacgccaaagaaaaagagggtgataagaaagaacttc
ctccaactggctcacaagaaagtggtatttttttctctatttctgcacttattagcacagctttaggtcttttcctattaaaatcaaataaaaatg
at

MSKPMTKKKKAISIQKSVKPILGFTFGALLLSTVFTPSVFAEEVVSSLGHATSGLLSVSVPKEL
TSLETTTYLMASESPSNTLTSDTISSDNGGTASNPNEIVTTETTSEAIPFDTEVIQNPDLPIGEIK
VVQEGVAGEVTVTKTTTTITLNGVSQSTTTESRVPVKKPINKIIEVGTKEISTSPSSSDVITVSPS
PSSTSSESNQQGSLTPAPKSRQNSQEKKGSQTKKSKDDAKEKEGDKKELPPTGSQESGIFSLF
SALISTALGLFLLKSNKND

SEQ ID 20

atggaaatcaaacaaaaacatggcaagcatgccttacgcaaagcggtcaccgcagcggtcttagcagggacagctttctcaa
gcctaggaggattcgcaggagcagtcacaacagtcaaggcggaagatttatttactataaataattcagaagtccaagataa
gttagaatcaaaggtaaaacaacttttggaagcccaacgaaaaggagaagacattagcgaaaaactacgagagttattaag
tgaacttccaaccgatattttaaaggatattatgctatcaaatattgaagctgactatcttttaggatttctaaaaccagctgttg
aggaaatggtgagaagatctgaacaaaatgacgagcgttggaaagatattacagaaaaaacactagctttagaggctttaa
aagattcagaaagagaaattaggaaagaaaaagagaaacttgaggatgaagttcaacttgcaaaggtaaaaatagaaac
taaagaatcagaattaaatgatttaaaaaaagattatattgatactagggaagaattagcagatactattgaagaactagac
gaagttaaaaattcaattgtagaaaaagaagcaaaagttaaaggcttagaagaaaagttacgtgatttagaaaaagaatt
aggtgactacgataaaaaattaagtgaagctgctaagcaaaattcagatttatcaaatgaaaacaaagagttgaaagaaaa
cttagatactgctgagaatattactgttgaacttcagaaaaaatctcatgaattggaaaaaactaaaaaagaagttgaatta
gagctgaaagcagaaaaagaagcccttgaggcagaaaaagttaagttagcagaagctaatgaagcaaatgataaactatc
tgaagaacgtgatgctgccaagaaagaagctgaaaaagttcctgaactagaagggcaagttgaaaaattagttgaagaaat
cactgctgctaagaaagaagcagaagagcttcaagctaaagccgaaggccttgaaaaagacttcgaagctgttaaagcaga
aaaagaagcccttgaagctgaaattgctaaattgaaagaagaccaccaaaaagaagtggacgcgcttaatgctctccttgct
gataaagagaaaatgcttaagagcttacaagaacagcttgacaaagctaaagaagaagct
atgaagaacgagcaaatgagccaagaagaaaaagctaaattgcaagctgagttggacaaagctaaacaagaattggcag
aaaaaatcaaagacatgccaaacaaagtggctcctcaagccgaaggcaaagccaatgcaggtcaagcagctccaaatcaaa
accaaaacaaccaagcgcaagcaaaccaagctaagaacgcaaacaacctcccatcaacaggtgacaaaccagttaacccac
tcctagtggcaagtggtctctccctcatgatcggagcaggtgccttcgtctacgccggcaaacgcaaaaaaggttaa

MEIKQKHGKHALRKAVTAAVLAGTAFSSLGGFAGAVTTVKAEDLFTINNSEVQDKLESKVKQ
LLEAQRKGEDISEKLRELLSELPTDILKDIMLSNIEADYLLGFLKPAVEEMVRRSEQNDERWK
DITEKTLALEALKDSEREIRKEKEKLEDEVQLAKVKIETKESELNDLKKDYIDTREELADTIEE
LDEVKNSIVEKEAIKVKGLEEKLRDLEKELGDYDKKLSEAAKQNSDLSNENKELKENLDTAE
NITVELQKKSHELEKTKKEVELELKAEKEALEAEKVKLAEANEANDKLSEERDAAKKEAEKV
PELEGQVEKLVEEITAAKKEAEELQAKAEGLEKDFEAVKAEKEALEAEIAKLKEDHQKEVDA
LNALLADKEKMLKSLQEQLDKAKEEAMKNEQMSQEEKAKLQAELDKAKQELAEKIKDMPN
KVAPQAEGKANAGQAAPNQNQNNQAQANQAKNANNLPSTGDKPVNPLLVASGLSLMIGAGA
FVYAGKRKKG.

SEQ ID 22

ttgcgatataaaaaaatgacgagatcgtcaaatagcagaatagttttacaatcgacactgattatgattttgcttcaagctgtgtaaaccat,
tttaaaggaacaattcatgcagatgaaaaagtgattaatggttcagaagcttcaatccaagttgattatacattgaatactgcatctgaaaa
cagacaaattccagaagaaaaggtaactgaggaagctacaaatgatcagccggaacttttagagaagcaagcggcatttttacatgaagg
ccgtgaaaaaaatactgagaatttgccttagatggtagaggaagtctgattgctagtattgattctggagttgatattaagcacgaggcat
ttgcaaataatgatgataaccatgatttttcataaagagacagaagtttctgaaggttctacttcaaaaattccctttgtttatgattttcttagt
ggtgataccagtgtgagagatgacgaagaagaacatggtatgcatattgcaggaatcttagttggtgattctaaaaaaggtttcaaaggg
atggcacctaaagcacagctaattgcatatcgaacttggagtaaaaataatagtgaaggttatcaagaagcaaaccagtttttgcaatga
aagatgccatcaaacgtggtgctgacgtgattagcttgagtattggtgagattggtagtgggcaaaacgatgatatttgggcaaaggtatt
agaagaagcgaaaaagaaaaatgttgttgtcgttgcagcaatgggaaactatgggacatcagcaacaagtaatacttttgatcaagttgtt
gatgaaacttcccacaaaccgatagttccacttgctttctgtatctgcaaatcccgaagtcattggtgttggctctatttttgaaaaagaaat
gtatttaccaacactaaaaattgatactttagaagtaccttatgaaaatatcaactggcaaaattattacctttttaagcaagaaaagcaag
aacgtatttctttaatgaaatgttaataaccttaaaccaatcaaaagaagaaggaagtttaaaagataaagttgtcatcatagaacgtca
agcagaaaatatttttcctcaattaaaagaagtgatgaaaaaaggtgctaaaggtgttattttgattaaccaatcaggaccaactacttatg
gtaac
tatgagacagttccagaattaagaaatacccttattagatgatgaagatggtgatttcaaaaaaacatgggctgttagcatttcagcaaacg
atggtaaagcattgaaagattaccttcaaaaacaagacaagaaaaaaagctattcacttgtgtttaatacaaaaccacaattgaaacatg
ttttcaaatatccaggtgtatcaggttttagtacttgggggccaggtcttgatttaacccttaaacctgatatagtagcaccgggagaaaatat
ttattctacaggtaatgataatagctatttttattagtagcgggacttcaatgtctgctccaaaagtcgcaggggcaagtgccatgtttctccca
gtgacaaaaaaatggcaaaaaaaaatgggaaaaacaaaatgtttccatgtctataccacaattaacgaagttattgttccaaaatacagcg
gatattctttatgatcatagtgtcccaaatggtaaacctatattaccttactcacctcgaagacaagggcagggggctttaaatgtgaaaaaa
gcagcacagacgaatgtttttgtaacttctgcagataataaaggagcaatactgttaaaagattttaaagaaagtcgtaaagagtttgata
ttgtgatcagaaacttttcggatcaagtcagacgctttaaaattgaaccaggatcagttttaggaaagattctttattcaaaagacagaaaa
aattatgataaaaatgagactattcaaaccgtgcactctagggttattaaagattcggccattgagagtccattatatgttcaaatagctcca
aacagttcaatgattcttcctctaaaacttaatgtgggaaaagcagttgaaaatgaatttgtggaaggtttataaagcttcgctcattaga
gaaagatcaaccggatttaaacattccattcatgggatttatggtgattggaactcagaaaacattttagatccagtagcctggcaagaag
gaagcaagactcgtttaactggtatcgttcatccatatggtttaggagaagataaatttgatatcgtgccttgggggttgactatgaaaaat
ggaagcaagaccctaaagctttagatgcagatcaacggttttatgttatgcagagtcaggctggcattgccaaccatgctaaaatgcgtcta
cgt
ttaatatttatgcgacatgctaaggattaccgtgttgatatcctaaattctcaaaaagacaaggttttaaaaaccttaaaaacaggtcatcag
gcccctaagtatatggaaagtgcattattagaacatggagatcaatatcaaatgcaatttgcagattttgatcctgatttagaatgggatgg
aagtgtctataatcctaaaacaaacactgaagacccctacctgacggaaactatttattcgggtttcctccagaatcagtaaaaatcgtcc
atatcaagagcatattattcccttgccattgataatcaaaaacctaaagtaaaaattgaagaaaaaactgctcttcaagttgttttcatgtt
gatgatgctcaccttcaaggaataaggctagtaaaagataataagattattcaaaccttagaaacagacactcaaggaagatttcgactta
atcttgctgatttccaaggtaagggatttgaattagaggctatagattttgcagaaaataaaacaatcatagatttagattctcttaaagaa
aaagaagtaggatatttatttggcgcaagtagtagttataacaaatccaggtatcgatcaccaaggtcagtagcccataaaaatgctgaag
atattcttcatgagaattcagaggaaagtgaggagatagcatcagcattaacttttgaagatgggagtgattttcacgatggtaagaaaac
aaatgcgtattcagagattaacaaaagtaatgataatagtgtccatttaaaagataatacttattatcgtgactattatatccatttaaaag
aagggcaacgtcttttagttaccacaacaaatgcatttcataatagtaaacaaggaaatgatatcacagcgccaacatggcaagctaacta
tacttatgatccttcgacaaatcagggacaatattatcgtaagattgctattccgatttatcaaggatcaaatactataaatgtaaaagcatt
ttataaggataaattaatatttaataaaggatacgcggtaaaattagatacagaagttcctcaattaacttttgataatccaaatattagctt
tacatctgataaatggcaaaacctatctgatgatgagtatgatgacgataatattgttggtactatcacaattccaaataataccttaagatt
a
tccgggaagattcgagacggtctagatggatggagaatgtttattaatggagacatggtcgatagtgatatttaaactaggtgaatatgatg
atatttttcaacaaaatagaagacaatggaaatatgaaaaacaagttgaaaatgatgactatgtgctcataaaactgagtgatcatgttta
aaaacagccgaagttacctctttaaagtaaaaattgatcctactgtttcagagtatcatttcacaaataaaaatgacattattgatgatgac
aaaacattgttaacattaaacaccttaaccgatagctcattgggatatgctaataaactttaaatatgccaaaagatttggttaaatcaac
agatgatctttttaaagccatgacgatgttatttaaaaaggaaagttttttccttatccgcttaaaaatgatttaaatactaatggaattagt
atgatgacaagtttggtgcagttccaagcaaaggatgttaaagagaatataccattagaatgggaaataaaaaccaaagcatccgactca
aggcagcttctttatcaaaatcttaagaacgaaaaagaaaggttggatcaggtttccactaatccactagctcatcaattacctctggaaaat
tctaatcaagaaaatggacaagacgctatttgacaagtacaaaagtcttaccaatgtccaaatcatctatattcagagactcgttacgtga
gacgagtctgccagaaactcgtgactcttcatcaatggcaaattggtcattagctttcttcttatctgcagtgatatgtttctttaaaggaagaa
gaaaaagactgaataagtta

MRYKKMTRSSNSRIVLQSTLIMIFASSCVNHFKGTIHADEKVINGSEASIQVDYTLNTASENRQ
IPEEKVTEEATNDQPELLEKQAAFLHEGREKNTENLPLDGRGSLIASIDSGVDIKHEAFANND
DNHDFHKETEVSEGSTSKIPFVYDFLSGDTSVRDDEEEHGMHIAGILVGDSKKGFKGMAPKA
QLIAYRTWSKNNSEGYQEANQFFAMKDAIKRGADVISLSIGEIGSGQNDDIWAKVLEEAKKKN
VVVVAAMGNYGTSATSNTFDQVVDETFPQTDSSTLLSVSANPEVIGVGSIFEKEMYLPTLKIDT
LEVPYENINWQNYYLFKQEKQERISFNEMLITLNQSKEEGSLKDKVVIIERQAENIFPQLKEV
MKKGAKGVILINQSGPTTYGNYETVPELRNTLLDDEDGDFKKTWAVSISANDGKALKDYLQK
QDKKKSYSLVFNTKPQLKHVFKYPGVSGFSTWGPGLDLTLKPDIVAPGENIYSTGNDNSYFIS
SGTSMSAPKVAGASAMFLPVTKKWQKKWEKQNVSMSIPQLTKLLFQNTADILYDHSVPNGKP
ILPYSPRRQGAGALNVKKAAQTNVFVTSADNKGAILLKDFKESRKEFDIVIRNFSDQVRRFKIE
PGSVLGKILYSKDRKNYDKNETIQTVHSRVIKDSAIESPLYVQIAPNSSMILPLKLNVGKAVEN
EFVEGFIKLRSLEKDQPDLNIPFMGFYGDWNSENILDPVAWQEGSKTRLTGIVHPYGLGEDKF
DIVPWGVDYEKWKQDPKALDADQRFYVMQSQAGIANHAKMRLRLIFMRHAKDYRVDILNSQ
KDKVLKTLKTGHQAPKYMESALLEHGDQYQMQFADFDPDLEWDGSVYNPKTNTEDPLPDG
NYFIRVSSRISKNRPYQEHIIPFAIDNQKPKVKIEEKTALQVVFHVDDAHLQGIRLVKDNKIIQT
LETDTQGRFRLNLADFQGKGFELEAIDFAENKTIIDLDSLKEKEVGYLFGASSSYNKSRYRSPR
SVAHKNAEDILHENSEESEEIASALTFEDGSDFHDGKKTNAYSEINKSNDNSVHLKDNTYYR
DYYIHLKEGQRLLVTTTNAFHNSKQGNDITAPTWQANYTYDPSTNQGQYYRKIAIPIYQGSNTI
NVKAFYKDKLIFNKGYAVKLDTEVPQLTFDNPNISFTSDKWQNLSDDEYDDDNIVGTITIPNN
TLRLSGKIRDGLDGWRMFINGDMVDSDIKLGEYDDIFQQNRRQWKYEKQVENDDYVLIKLSD
HVKNSRSYLFKVKIDPTVSEYHFTNKNDIIDDDKTLLTLNTLTDSSLGYANKLLNMPKDLVKS
TDDLFKAMTMLFKKESFFLYPLKNDLNTNGISMMTSLVQFQAKDVKENIPLEWEIKTKASDS
RQLLYQNLKNEKERLDQVSTNPLAHQLPLENSNQENGQDAILTSTKVLPMSKSSIFRDSLRET
SLPETRDSSSMANWSLAFFLSAVICFFKGRRKRLNKL

SEQ ID 23

gtgtcaaaaggtcaatctgatttaagccatgcggaacaaggtgttgatgatcaaattacaattgctaaaaaagatagtatctcagtaacaa
ctgattcaaaagatttaacgccaaaatacattgatacaaaaggcttgactggttcagctttaacaacagcaatggaaaaaaacattgcact
gtataatcaagcggttaatgatggcgtaggtattatggatgcttcaagcgtccaaatgaaaaaacaaattgctgattatttaacagctttga
caaattatcaaaagggtgtttcttcaaatacaggattacaatggcaaaatagtgttgtcttagaagcgggctcaggtgcaagtagacaaac
aggcactgaaaatgttgttgattttagtgatggaacgattaaagcagcaggtatgtatgcgacacaaggtcaaaatttagaccaaaatact
gatgcaaattttgataatatttttaagattgagggaaccgggattatttgggtaaagaatacgaccaatggagatgttaaattgactttctct
gaaattaatagtccatacaatacaggtacttacgttgctatttgggtgatgacaaaggtggtattgcttggtcagtctttgccttatactatg
gtggtgcgagtggtggagctggtgaaacaggttctaatacaggttctggtatcagtggtcgcatttaaattatgtgaattcatataaagcaa
cagtagaaacaacaagaggtgtttcagttgtaacttttaatgacattgataatcaacagacagttaaaatgtcgggacttgataatgccaa
agtaacaacaggtgagaatattaatcagacaggaaatgattttgttgcaggttcgggtgacgtttctcaaagttcagcaggagttttaggaa
ccaatggtgttaaatggacttttacaagtgctgataggcgtttattctcatttactcattctacagcaggaactaaaaacacatcaatcgtagg
tggtatttttggatcagcgtctaacgtacctcaaaagccagtaattcctaaactaaccgctcataaagcaatcgttacaggaccaaagggtcc
aagcatccctgttaatcaaaaagtgacggttcattactataggtttcggttacacctacaccagaaaatccagttactccacaaaaaaaca
tt
acttataaaccaattacaaccactccacaaacaccagtaagccaagcaaatgtgggacttccaacaactggtgataaagcagatggttcta
ttgttcaaatggtaattggtgcattaatggtatcatttgttgggttttcagcattaaaagatcggaaaaaagaaaaa

MSKGQSDLSHAEQGVDDQITIAKKDSISVTTDSKDLTPKYIDTKGLTGSALTTAMEKNIALYN
QAVNDGVGIMDASSVQMKKQIADYLTALTNYQKGVSSNTGLQWQNSVVLEAGSGASRQTGT
ENVVDFSDGTIKAAGMYATQGQNLDQNTDANFDNIFKIEGTGIIWVKNTTNGDVKLTFSEINS
PYNTGTYVAIWGDDKGGIAWSVFALYYGGASGGAGETGSNTGSGISGRILNYVNSYKATVETT
RGVSVVTFNDIDNQQTVKMSGLDNAKVTTGENINQTGNDFVAGSGDVSQSSAGVLGTNGVK
WTFTSADRRLFSFTHSTAGTKNTSIVGGIFGSASNVPQKPVIPKLTAHKAIVTGPKGPSIPVNQ
KVTVHYYKVSVTPTPENPVTPQKNITYKPITTTPQTPVSQANVGLPTTGDKADGSIVQMVIGAL
MVSFVGFSALKDRKKEK

SEQ ID 24

atgttaaaaaaacaattattagtcctaacttgtgtttcaactcttggactagtagggaccacagcttttgctgaagatgtagtcccggtagatc
caactaccccatcaacagaagtgattacaccatcaaccccaatagatactggtttaccgtctgatactactgaccctagcactccggttgaacc
cgagactcctactaatcctactaatcctagtactccgatagatccaggaactccaactgatacgacaacgccaacagatgatacaacaacac
ctggaacatctactagtcccctcagattcagagtcaactaacacaaatccaggcacaaaaccaacagatgaagtaaaaccagttaccccatct
actcctgaagtgccttcaactgttactccaggagtagttgataatgttgataaagaaacaggtaatattaccattaaaccaatcccaattagc
ccagataaaacagttgttgggactcagaatgggaatgtgcttattcaagatcgctcaggaaggtatttagtatctgctagtgaacttggtggt
cgacttaatgatgatggaactgtaacaatcaaagattcggaaggaaaagaaaaaacacttcctcatacaggtgaagaaaaaggatttttta
agtatcattggtggaacaatcttatcttttgtagccttcttattcaagaaaaaaataactttaaat

MLKKQLLVLTCVSTLGLVGTTAFAEDVVPVDPTTPSTEVITPSTPIDTGLPSDTTDPSTPVEPET
PTNPTNPSTPIDPGTPTDTTTPTDDTTTPGTSTSPSDSESTNTNPGTKPTDEVKPVTPSTPEVPS
TVTPGVVDNVDKETGNITIKPIPISPDKTVVGTQNGNVLIQDRSGRYLVSASELGGRLNDDGTV
TIKDSEGKEKTLPHTGEEKGFLSIIGGTILSFVAFLFKKKITLN

SEQ ID 25

atgaattcaaacacaaaaggacatggttttttcagaaaatcaaaagcatacggtttagtatgtggaatcgcactagcaggtgcttttgctttt
agtggagggaatgtatcggcagatgaagttactgctccagcagaacgtcaaactgttgtaacaacettaacagagccaacaaataaccaa
gcacaagcagttacgtcagaagcacttaatacagcagtttcaacagctaaagaagcaggagtaactgttaacacaacaggagcagttagt
catacagatgttccaagtgcacaatctgatttagctagtcaaacacaaactgttaaagatgcgactgctaaagcagaagctaatacacagg
ctattaaagatgcgactgcgcaaaatgctcaaattgatgctcaaaatcaggcagaagctacacgtgttgctgaaataaataaagcaagtca
acttgcggttgatcaaaaaaatgcccaaggtcaagcactcgttgataaacaaaatgctgatgcacaagcacaagcagatgcgacaaatgc
acaacttaaagcagattatgaagctaaattagctgaaattaaaactgttgaagactacaacaaagcagtagctgaacgcaatgctttagct
aaacaacaagcagatgcgacaaatgcacaacttaaagcggattatcaaactaaacttgatgcatataacaaagcgttagctgataaaatc
aatctaatagctaatgatgttacttttaaaggttatggtaaatcagaagatttaaatgcttatggtatagtaacttctgatactataacaatt
gatggtgcaggaaactttatattaaaagaaccaatgtctgatccaacagggttattggttatatcactacaaaaggtaaattaaactattc
tagtgtttatgatccaacacttaataaagcgaatattacgattgattcaattacttaaatacatggcagttagatttgaatcgcccctcaattt
caggaaatactaatgcatttgcagaatacattgggttagacggaacttcgttatttaagcaagcttatacaggtctaacctcaatgtcaccga
ttactatcggtaaaactagtcaaattggaaagacattcactgtggcaagcgggaaacaacaccagaatttatgttcttgaaaacaaatcc
gttctgggag
ttttcgcaccatcttctttatttgcggaattaacctataatacagcaccattaccaaataaacctattgaaccaacattggttactgttacccca
gaagcacttaaaccagttccacaaacacccccaactccagtttatgtgacaccaaatctcaaatccttcacacctgaagtttacaccccaatca
aaccaactgttaaaccccacgttgctgtacctgataaattagttgtcacagtatcagtacatcctgttgtggttccagttgcgaatccttctaaa
gacgttgtagatcaagcaggtaaatcaattaatggtttatcagtgttacctaattctgacttaaactacgtggctttacaagacttagtcaat
ataagggaatgagtgcttcacaagataaaatcgccaaaaacttatcttattgatgactacaaagatgaagcactagacggaaaatcaat
ggttgttaatagcattaaagctaaaaatggtgatgatgtgtcacatcttttagaaatgcatcatgtattatctaaagatggcttagatgtcaa
acttcaagctatcttggctgaaagtggattatctccagttggtgaattctatatgtgggtagctaaggatccaacaagcttctataaagcttat
gtgcaaaaaggtttagatattacttacaacctctcattcaaagtacatcaaacatttactgaaagtgaaattgttaatggtgttgctcaaatt
gattttggcaatggctatcttggaaatcttgtagttaatgatttaccaaaaccagaagttcataaagacgtcatagatgaagcaggaaaatc
tattaacaacggtactgtaaaacttggtgatgaagtcacttacaagctagaaggttgggtcgttccaactggacgttcatacgatttattcga
gtacaaatttgtagatcagttacaaaatacacatgatctttatttgaaagatagtgttgttgccaaagttgatattactctatcagacggtac
agtcattacaaaaggttctgatttagcacaatatactgagacagtttacaacaaagaaactggacgctatgaattagcgttcaagaaagat
ttcttggctaaagttgtacgttctagtgaatttggagcagatgccttcttagttgttaagcgtattaaagcaggtgatgtc
tataacacaactgatctatatgttaatggtaacaaagtgaagtctgaaacagttgtgacacataccctgaagcaccaaaaccagtcactcc
aactaaagaagtgccaaaaacacctgaaaaagtacttccacacacaggagaagaaggctttcaattttgaccgttattggtgcaagtatt
ctttcagtacttggtctttcagtacttaaaaaacctaaagaaaat

MNSNTKGHGFFRKSKAYGLVCGIALAGAFAFSGGNVSADEVTAPAERQTVVTTLTEPTNNQA
QAVTSEALNTAVSTAKEAGVTVNTTGAVSHTDVPSAQSDLASQTQTVKDATAKAEANTQAIKD
ATAQNAQIDAQNQAEATRVAEINKASQLAVDQKNAQGQALVDKQNADAQAQADATNAQLKA
DYEAKLAEIKTVEDYNKAVAERNALAKQQADATNAQLKADYQTKLDAYNKALADKINLLAND
VTFKGYGKSEDLNAYGIVTSDTITIDGAGNFILKEPMSDPTGVIGYITTKGKLNYSSVYDPTLN
KANITIDSITLNTWQLDLNRPSISGNTNAFAEYIGLDGTSLFKQAYTGLTSMSPITIGKTSQIGK
TFTVASGETTPEFMFLKTNPFWEFFAPSSLFAELTYNTAPLPNKPIEPTLVTVTPEALKPVPQT
PPTPVYVTPNLKSFTPEVYTPIKPTVKPHVAVPDKLVVTVSVHPVVVPVANPSKDVVDQAGKSI
NGLSVLPNSDLNYVALQDFSQYKGMSASQDKIAKNFIFIDDYKDEALDGKSMVVNSIKAKNG
DDVSHLLEMHHVLSKDGLDVKLQAILAESGLSPVGEFYMWVAKDPTSFYKAYVQKGLDITYN
LSFKVHQTFTESEIVNGVAQIDFGNGYLGNLVVNDLPKPEVHKDVIDEAGKSINNGTVKLGDE
VTYKLEGWVVPTGRSYDLFEYKFVDQLQNTHDLYLKDSVVAKVDITLSDGTVITKGSDLAQYT
ETVYNKETGRYELAFKKDFLAKVVRSSEFGADAFLVVKRIKAGDVYNTTDLYVNGNKVKSET
VVTHTPEAPKPVTPTKEVPKTPEKVLPHTGEEGLSILTVIGASILSVLGLSVLKKPKEN

SEQ ID 26

atggagaaacaactctaggtctcgccaattcagctgatcagacgattgccttaaaatatgaagccaataatctgaacttggtttcaacagt
gcttcatgaaatgacgcatattatcgactttaagagtggcctctattcagaaacgactgaccgtaatacagatggtagtcttagtacggtcat
ggccttttcagatacccaagagttcttagatgtctaccatacctatttgaccgaccggatgtttggtcttactatcgtgataacagcgaagaa
gcttttgctgaagggctcagtcagtatatcatgcaccgtctctttggaacaccatactcgacatatattgccaatccttatactggagatgccta
caatccaggtgatggttcaggttatagcccatttgcggaaacagaattttatttgccagcttatacaaccgtttatttgaatacccgagaaca
gctcaagttgttccatatcttgtcactactacgacaacagctccagtaaatggtcaagttatttacggagcaatgccagaggaaacaactaca
acaacaccttacacaacagtttatgtgggagataccagtttcgcctatgaccctactggacagactgaccgtgtacaagcaggtgtcgatgg
gacagaaaccattcgcacgacctactcactagatagcaataaccagttggtagcaactcagacggttatttcatctactcctgttcaaaatca
aattattacaaaaggcactcaacctaccgttgttgacactagtgttccaatgactattgtttatcaagaagtcacagatggttcattgggtgac
tggcaagttaacgttttggatgcaggtcaagatggcttaatccgtagcacaacaacctatagtgttgatcctgtgacaggtattgtgacacca
agtacaacagaagctactatcacagcaatgagaccaatgattgttcaataccaagttggttccgaaaaagtgacagctattccttaccaaac
ccgttatgttatagatactagtttagcaactggaacacaagttattgtacaagaaggtgtcaacggtagctcaaccgagagtgttcagtctta
taactttatccaagatggctcaaatagtcgatttgacgctattgtctatgctagtccagttgttgtagctgcccaagaccag
gtgatagcagtaggaggtcaagaccaagtaactgaccaagctgtcgcaaaaacgattttctatcaagaagttactgatggttcattgggcg
actggcaggttaaagtcttagatgcaggtcaagatggtttggttcgtacaacgacaagctatagcgttgaccctgtgacaggtattgtgaca
ccaagtacaacagaagcaactatcaccgcgatgaaaccaatgattgttcaatatcaagttggtaaatctaaacttagtgccattcctttcttg
acagagtatataactgatgatagcttagctgttggcttagaaaaagtcattcaagaaggcgtcggagggactcaaatcgagacagttcaat
cctttaatttattcaagatggtgcaaattctcattttgaaaacattgtctacagttcccaactattgttgttgctgctgttgatcaagtcatag
cgcgtggaacgaaagtagttgaagttgtagttgcagtaccagaagttgtaacaccgaaaccagaaacatcggaagtgataagtcctgaaa
aaggccaaacagctcctactattacagttgaagctattaaagccccggctcagaaaaaggctaaagttgaagttgttacaactccaaaaga
aagtttgccaacaactggtgatgatcaaaatctactcgtgactctcatgtcaagtctcttattaatgagtctaggtttaggacttaagaaaaa
agaagacgaa

MGETTLGLANSADQTIALKYEANNLNLVSTVLHEMTHIIDFKSGLYSETTDRNTDGSLSTVMA
FSDTQEFLDVYHTYFDRPDVWSYYRDNSEEAFAEGLSQYIMHRLFGTPYSTYIANPYTGDAYN
PGDGSGYSPFAETEFYFASLYNRLFEYPRTAQVVPYLVTTTTTAPVNGQVIYGAMPEETTTTTP
YTTVYVGDTSFAYDPTGQTDRVQAGVDGTETIRTTYSLDSNNQLVATQTVISSTPVQNQIITKG
TQPTVVDTSVPMTIVYQEVTDGSLGDWQVNVLDAGQDGLIRSTTTYSVDPVTGIVTPSTTEATI
TAMRPMIVQYQVGSEKVTAIPYQTRYVIDTSLATGTQVIVQEGVNGSSTESVQSYNFIQDGSNS
RFDAIVYASPVVVAAQDQVIAVGGQDQVTDQAVAKTIFYQEVTDGSLGDWQVKVLDAGQDGL
VRTTTSYSVDPVTGIVTPSTTEATITAMKPMIVQYQVGKSKLSAIPFLTEYITDDSLAVGLEKVI
QEGVGGTQIETVQSFNFIQDGANSHFENIVYSSPTIVVAAVDQVIARGTKVVEVVVAVPEVVTP
KPETSEVISPEKGQTAPTITVEAIKAPAQKKAKVEVVTTPKESLPTTGDDQNLLVTLMSSLLLM
SLGLGLKKKEDE

SEQ ID 27

atggtgaaaaataacattcactcgagaaaaaaacatatattaaaaatctcattattagcaacaagtgtattaacgacaac
agtttcaacagtctcagcagagcaattgcaaaatgaaaagcagtcggatttgcttagtaagatgacagaaacatctacgc
ctcatactatcataagttcagaagacctctcaaactcaaatcaagaggccaatcaaaaggatgagactgcctcaaaaagc
ttacaacctatgattgaaaaagtcgatccatctcatatccaggctctttgggaaaaagttggcacaggggaaggagatgt
cttagctgtcatagattcaggaattgaaaccaaacattccatgctacagcttccagaggatgctgacaaaatgtacacag
atcaagccagcattgacagtaagaaacaattattaggtattgaacgaggacagtggataaatgataagctcccattttac
catgattacacacaaggggaagagtctattgacagaaatacctaccatggaacccacgtcgcagggattgcaactgcttc
aggcctaacacagaaagaaaataaggagcaaatgcaaggcattgttcccaatgctcaattattatttttaaaagtagggc
aaccaagtgtagaaggtgaaagagaaaagcattatgccatggctattaaagatgctattgctttaggagcaacagctatt
aatatgagttttggacaagttggaaaagctagccatgaacttaatgatgatttcaaaaaagccttagcattagcagcaga
taaaggcgtcgctattgttgttgctgcaggaaatgattatgccatgggcggcagccagacgaaacctcttgcgaaaaatc
ctgatacaggtgtcattggaactccagcaactacggaggaggttttacagtagcagcatatgttgcaccgcactattgg
agcagagtactatcggttactgacggtagcacatcaaaagccttggcgcttgaaatggctagtccatttgcagaaaataa
ggactatgagctcattttcttagaaaagggattagaaacggaagagaatgcagaaagactgaaaaataaggttttagtct
tgaattatgactttgttaccaattccaaagaagttgctgaaaaagttgaggctttgggagcagctggtgtacttgtccac
aataatcaagctaaaaaaccgctcattccttagcttataatggtcctttacctatgggctttatcagtaaagaggatgc
agattggttaaaaacgatgacaagtccacagtttagattaaaaaaagagaagcaattagttgaggtgcctggtggcagac
aaatgacaaactttcaagctgggcttatcagttgatggcaatatgaaacctgattttgctgcacctggctatgaaatt
tattcacctactccaggaaacgactactcaaagatgtcaggaactagtgctgcaagtccacatgctatgggaattattca
tttagtccgtaaacacattcagaaagaataccctcacttaagtgctaaggaacagttacagttagttaagaacttattaa
tgtctactgccagtccaatttattcagagttagatcacagttactattctcctagggttcaaggagcaggggcactggat
gccaaaaaggcccttgaaacagatgtttatgtaacagctgcggatggtctttcaaaaattcaattaggtgatgtcaataa
tcagttcgaattaagagtaaccttacataatttaagcaatcaggaaaaaaactttacttactttgcaagggtgcttactg
acaaagttgaaaaggggcgtattctcttgcgtccacaagagctatatcaaacgagacccctccaagtaaaactagctccg
aatcaaaagcaagaagtggttatcaaggttgatatttctaacttgatcaacagcttaaagctcaaatgcctaacggtta
ttttctagatggttttgtagtatttcagtctaaggaaggtgctcaaaaagacttatctattccctttatcgctttcaaag
gaaaatttgcagatttagaggctcttgatagtccaatttatcgaaatttagatggtacgttttactacagccccaaagaa
ggccaagacccttatgactttgaagtggatagtatccaacaaattaaagaacaatatatgactggtcttataacaacatt
tacgccttggtcactggttgaaggaagtaaaatagatggctttcaccagagatggcttctgaatttagcacgactgatt
acctcggttcctataataaagaaggagataatacagttcgtcgattccgatttgtcgaaggcaaaccttatctagcactt
tcacctaatggcgatgataatatggataaagtgggatttagaggtgtttttcttaagaaatgtcagagacatcaaagcaca
ggtatttgcaagtgatgatttgcaacatccgatttgggagagtcctataaaagcttttgctaaaaaagatgtgaatacaa
atgatatcaaagaaagcatgcttgaaaataccgtttgggaaggtaaagatgcttctggaaatccggttacagagggatta
tatcgatatcgtgtaacttatacgccacttgctgaaggggccaaagaacagtttattgattttgatattctagttgattt
aaccccgtcaaaactgccacaaagtgcaatcttgatgctagccgaaagacggattgagctaacagaatcaagagactatt
tatctcatgatacttatcgtgatcgacttactataaatatggaacagatgatattaatttcaccacttttgaaaaagat
gatatgggacattttgtgatcccaaaccaagttgaagatgaactcagtggagagaagattactatcaatcttgataaaac
tgatcatttctctcttttgtcagagaagatttctcaggtaattttagtgttattagcctgtcacaattattgaacaatcatt
cagatcaaatgcattcacttgaagagagtaagagtgatagaaaagaatctaatacaggtgatattagacacgaaaagcaa
gaaaatcttagtcaacaaactctactatcgacaccatcaattgatggccaaaaacaaaatgaccaattaatggttgaaaa
agagaaagacattatggatgaaagtaagtctgaaagaagtgagaaaaataagtttccaaaagttcccgcttcaatcacgc
ttaaggatggaactctttatccgcagtcaataagccaaaaaacaagtcttcctaaaacagttgattcacaaaagacaatg
acatttttagggattgccatgttatttggtggcatattacaagtcctatggtcatactttaaaaagagagat

MVKNNIHSRKKHILKISLLATSVLTTTVSTVSAEQLQNEKQSDLLSKMTETSTPHTIISSEDLSN
SNQEANQKDETASKSLQPMIEKVDPSHIQALWEKVGTGEGDVLAVIDSGIETKHSMLQLPED
ADKMYTDQASIDSKKQLLGIERGQWINDKLPFYHDYTQGEESIDRNTYHGTHVAGIATASGLT
QKENKEQMQGIVPNAQLLFLKVGQPSVEGEREKHYAMAIKDAIALGATAINMSFGQVGKASH
ELNDDFKKALALAADKGVAIVVAAGNDYAMGGSQTKPLAKNPDTGVIGTPATTEEVFTVAAY
VAPHYWSRVLSVTDGSTSKALALEMASPFAENKDYELIFLEKGLETEENAERLKNKVLVLNY
DFVTNSKEVAEKVEALGAAGVLVHNNQAKKPLIPLAYNGPLPMGFISKEDADWLKTMTSPQF
RLKKEKQLVEVPGGRQMTNFSSWGLSVDGNMKPDFAAPGYEIYSPTPGNDYSKMSGTSAASP
HAMGIIHLVRKHIQKEYPHLSAKEQLQLVKNLLMSTASPIYSELDHSYYSPRVQGAGALDAKK
ALETDVYVTAADGLSKIQLGDVNNQFELRVTLHNLSNQEKNFTYFARVLTDKVEKGRILLRPQ
ELYQTRPLQVKLAPNQKQEVVIKVDISNFDQQLKAQMPNGYFLDGFVVFQSKEGAQKDLSIPF
IAFKGKFADLEALDSPIYRNLDGTFYYSPKEGQDPYDFEVDSIQQIKEQYMTGLITTFTPWSLV
EGSKIDGFSPEMASEFSTTDYLGSYNKEGDNTVRRFRFVEGKPYLALSPNGDDNMDKVGFRG
VFLRNVRDIKAQVFASDDLQHPIWESPIKAFAKKDVNTNDIKESMLENTVWEGKDASGNPVT
EGLYRYRVTYTPLAEGAKEQFIDFDILVDLTPSKLPQSAILMLAERRIELTESRDYLSHDTYRD
RLYYKYGTDDINFTTFEKDDMGHFVIPNQVEDELSGEKITINLDKTDHFFFVREDFSGNFSVIS
LSQLLNNHSDQMHSLEESKSDRKESNTGDIRHEKQENLSQQTLLSTPSIDGQKQNDQLMVEK
EKDIMDESKSERSEKNKFPKVPASITLKDGTLYPQSISQKTSLPKTVDSQKTMTFLGIAMLFGG
ILQVLWSYFKKRD

SEQ ID 28

atgcgatttttgaaaggtaaaaaagtttttctagctgttataggtttggcagtcatgatgacacttgtcataatgttccaaccacaagcaaaa
aataagagtgtatctgctgaaaccctagcttcagggcaaacacaagcatttatcaatcaaatcgcgggtactgcaagccaaatcgcagctg
aacgagatttatatgcgtcagtcatgattgcccaagcggttttagaatctagtagtggccaatcaggtttaagtcaggcgccatattataattt
ttttgggattaaaggaagttataatggtggctcagttacaatgaaaacttgggaagatgatggattgggaaatccttatgaaattgatcag
gctttccgtgcctatccaagtatttatgattcccttatgattatgctaatttgttaagttcaccaacttatgtcggagcaagacgatctaatacc
ttatcttaccaagatgcaacagctgctttaacgggattatatgcaacagatacttcctataatgttaaattgaatgccattatacaaaattatg
gcttgacagcatatgatgttgttaatcctgcagttgcaacttccacaacagatgtccctagtgatagtgttgcaactgttgatactagccaata
cgtttggaacaaacacagaggaagttacacagatactagcactttagcacaagacgatgcttggtctcttttcataaaaggctat

MRFLKGKKVFLAVIGLAVMMTLVIMFQPQAKNKSVSAETLASGQTQAFINQIAGTASQIAAER
DLYASVMIAQAVLESSSGQSGLSQAPYYNFFGIKGSYNGGSVTMKTWEDDGLGNPYEIDQAFR
AYPSIYDSLYDYANLLSSPTYVGARRSNTLSYQDATAALTGLYATDTSYNVKLNAIIQNYGLTA
YDVVNPAVATSTTDVPSDSVATVDTSQYVWNKHRGSYTDTSTLAQDDAWSLFIKGY

SEQ ID 29

atgaaaaagatatttcaaagaaaatggttcaaacgaacatccattgttttaggtatttgcttgtagctctgattgccttaggttctttttatta
ttcaaagtcagccgtgattgatcgttatgttgttgctaaaagtaaaaagaatggcgggtcctttgaaaatattaaagctttttagtctgggat
gataccgatgaaatcattacaaatgatcaagcagctttgcttcattcacgccacttccaaaatcagagatttcctcgttaaaaaaagagctc
aaaagtgcaacagcctctgatccagtatacattaagtccattggtcatcgtttttggatttttccggattatcgggtagccatgaaaccaatgt
cactaaccttaaaaacgaatgtccctaatatggatctgctcttaaatcagaaaaaagtagcaacatctaattcggaaaattttacgacagaa
ttaaaaaggttaccaattgctgactacagtgcaagtatcaatgggacttacaaagataaaaaaatcaaagttactaaaaaatatgatgggg
caaaaaccagtactagatttatctgttacatttaagaattttacagtaagcagtaatcttacagaaggtgagctttatttttgacgaggatcgc
gtcggtactctaaaaaatggtcagtatcaagtcacagactatcccattactaatggtagcaaagcttttgtaaaacgaaatttcccagatggt
gagctcaagagtgaaaaagctgaccttgaacaggttgctgaaggttctgaactgaagttaacggtcgataatctcttagatcgcactaaag
ctggagaatatctttagctgcttttaatcaactgatggcatatacaagtagccgacaagattcaacgacagttgcagatgtcttcgaaaatg
gcgtaaataacgatttttataaaggtttaaaagaaagtgtgaaagcaaaattggaaacagatagtcgcaaggcttctagttttgccatttcca
aatgttgccctaaatgccatgacgcaagtcggcaaggagtcttacctcttagattttgcggctacatatgattttgcctatccaaaagaaaca
gaccctgaaaaaggcagttcaggtaacatcattcaagagttaagtggacaactaacgctcaaaaaatcaggagatcgttatgtgattagtc
aagctggtacaaaaaatatctctgtgaccagtgaaaaaaataatattaaaaaaccgtcattactgccagatggcatagttggaacttggaa
ggaactaaagacgacattacctatacgttgaccatttctgaggatggaacagtaacacgtcatatcgatttcaaagatccgaaaaaagct
gatgaaagtagaacagcaaaaatcacgaagaccgaagaaaagaatccaggagatttccaggttattatcaccccagaaactgatagctc
aattctcatcattggtggtggtattggtggtgctaacatcaagtatgcctatggccttcatttagatggcaatcaattaacaccgattatttggc
aaacaggtatggataaggactttgatttttcgaaaccggcaccaggtttacctttaacgaaacaa

MKKIFQRKWFKRTSIVLGILLVALIALGSFYYSKSAVIDRYVVAKSKKNGGSFENIKAFLVWDD
TDEIITNDQAAFASFTPLPKSEISSLKKELKSATASDPVYIKSIGHRFWIFPDYRVAMKPMSLTL
KTNVPNMDLLLNQKKVATSNSENFTTELKRLPIADYSASINGTYKDKKIKVTKKYDGQKPVL
DLSVTFKNFTVSSNLTEGELYFDEDRVGTLKNGQYQVTDYPITNGSKAFVKRNFPDGELKSE
KADLEQVAEGSELKLTVDNLLDRTKAGEYLLAAFNQLMAYTSSRQDSTTVADVFENGVNNDF
YKGLKESVKAKLETDSRKASSFAIPNVALNAMTQVGKESYLLDFAATYDFAYPKETDPEKGSS
GNIIQELSGQLTLKKSGDRYVISQAGTKNISVTSEKNNIKKPSLLPDGIVGTWKGTKDDITYTLT
ISEDGTVTRHIDFKDPKKADESRTAKITKTEEKNPGDFQVIITPETDSSILIIGGGIGGANIKYAY
GLHLDGNQLTPIIWQTGMDKDFDFSKPAPGLPLTKQ

SEQ ID 33

atgaatacatcaaaaaaaattgttacgggatttgtaacgcttgcatctgtccttacccttgcagcatgttcttcaacaagtgacaatacaaaa
gtagttaccatgaaaggtgataccattacagtaactgatttttataatgaagctaaaacgtcaacagcggcacaacaatccatgttgagttt
gattttatcacgtgtctttgaaaaagaatatggtaaaagtgtccctgagaaaaaggttgaggaatcttataataaaacagctaagcagtac
ggttcttctttctccgatgctttagcacaggcaggactgacaacggacacctataaaaaacaaattcgcactacaatgttagttgaatatgcg
gtaaaacaagctgccaaaaaagaactaacagatgataattataaaaaagctttgaatcatataccctgaaatgacaacacaagttatt
gcttttgatgatgaagaaaaagccaaaaaagtttagaagaaacaaaagctgaaggtgctgacttgctaacatcgcaaaagaaaacac
gactgaagccaataaaaaaattgattacacctttgattcagccgacactgttttaccaagtgatgtcattaaagaaacagcaaaattaaatg
aaggtgaaaaatcagctgttattacagttatggattcaagaacttatcagaaaaaatattatgtggttcatttagtcaagaaagctgagaa
aaaagccgattggaaagaatacaaatcacgactaaaagaaatcattatgaatgaaaaggaaaacgacagtaacttccaaaacaaagtg
atttcaaaaacttagataaggcaaatgttaaaattaaagacaaagcctttgcaaatatcttgtcacaatttgcttctaataaaaacaatac
caacaatgctttaacaagttcagtaggtaaa

MNTSKKIVTGFVTLASVLTLAACSSTSDNTKVVTMKGDTITVTDFYNEAKTSTAAQQSMLSLIL
SRVFEKEYGKSVPEKKVEESYNKTAKQYGSSFSDALAQAGLTTDTYKKQIRTTMLVEYAVKQ
AAKKELTDDNYKKAFESYTPEMTTQVIAFDDEEKAKKVLEETKAEGADFANIAKENTTEANK
KIDYTFDSADTVLPSDVIKETAKLNEGEKSAVITVMDSRTYQKKYYVVHLVKKAEKKADWKE
YKSRLKEIIMNEKENDSNFQNKVISKTLDKANVKIKDKAFANILSQFASNKNNTNNALTSSVG
K

SEQ ID34

atgaaatcatggcaaaaaattatcgttagcggagcaagtttaacacttgcaagtacacttttagtgggctgtgcttctgactcaaaaggaaa
aacagaatcagcatcatcagattcaaaaacaattaaattgtgggttccaactggggctaaaaaatcttatgcagatactgttgctaaatttg
agaaagattctggttataaagtaaaagttattgaatcagaagatccaaaagctcaagaaaaaatcaaaaaagatgctactactgctgctg
acgtattttcacttcctcacgaccaacttggtcaattagtagaatctggaactattcaagaagtaccagaacaatacactaaagatattgctg
caactgcgactgatcaagcaattgtaggtgctcaatataaaggcaaaacttatgctttcccatttggaattgaatcacaagttcttttctataa
taaagaaaaattaagcgctgaagatatcgcatcttatgatgcaattacaagcaaagcaacatttggtggtaccttcaaacaagctaatgctt
acgtaactggtcctttattcatgtctgttggtaacacattgtttggtgaaaacggtgaagatactaaaggaactaactggggtaacgaaaaa
ggtgctgcagtacttaaatggattgctgatcaaaagaacaacaaaggatttgttagcttagatgctaataacgttatgtctaaattcggtga
cggttctgtagcctcatttgaatcaggtccttgggattacgaagctgcacaaaaagctatcggtaaagacaaacttggtgttgctgtttatcca
aaagtgactatcggtggtgaagaagttcaacaaaaagcattccttggtgttaaattatacgctgttaaccaagcacctgctaaaggtgatac
taaacgtattgcagcaagctataacttgcttcttacttaacgagtgctgaaagccaagaaaatcaatttaaaacacgtcatatcgtacctgc
taacaaagagattcaatcatcagaagaagttcagtcaaatgaacttgctaaaacagttattacaatgggatcttcaaaagattacacagtt
gtaatgcctaaattaagccaaatggcaacattctggactgaaagtgcagctattttaagtgatactttcaatggtaaaattcaagaa
gctgattacctaactaaattacaacaatttgataaagatatcgcttctacaaaa

MKSWQKIIVSGASLTLASTLLVGCASDSKGKTESASSDSKTIKLWVPTGAKKSYADTVAKFEK
DSGYKVKVIESEDPKAQEKIKKDATTAADVFSLPHDQLGQLVESGTIQEVPEQYTKDIAATAT
DQAIVGAQYKGKTYAFPFGIESQVLFYNKEKLSAEDIASYDAITSKATFGGTFKQANAYVTGPL
FMSVGNTLFGENGEDTKGTNWGNEKGAAVLKWIADQKNNKGFVSLDANNVMSKFGDGSVA
SFESGPWDYEAAQKAIGKDKLGVAVYPKVTIGGEEVQQKAFLGVKLYAVNQAPAKGDTKRIA
ASYKLASYLTSAESQENQFKTRHIVPANKEIQSSEEVQSNELAKTVITMGSSKDYTVVMPKLS
QMATFWTESAAILSDTFNGKIQEADYLTKLQQFDKDIASTK

SEQ ID37

atgaacaagaaatttattggtcttggtttagcttcagtagctatattaagtttagctgcatgtggcaaccgtggtgcttcaaaatctgatagca
aagatgctaaaacagatttaaaagctgctattgttactgatacaggtggtgttgatgataaatcatttaaccaatctgcttgggaaggtttag
aagcttggggtaaagaaaatgggcttaaaaaaggtgctggtttcgactacttccaatcaaatagtgaatcagaatatgctactaatcttgac
actgctgtctcaagtggttataacgtagtatatggaatcggatttgcccttaaagatgcaattgataaagctgctggtgacaatagtgatgtt
aactatattatcgttgacgatgtcatcgaaggaaaagataatgttgcaagtgtaacttttgcggataacgaagctgcttatcttgctggtatt
gctgcagctaaaactacaaaaactaaagtagtaggttttgtaggtggtatggaaggtactgttatcactcgttttgaaaaaggttttgaggc
gggagtgaaatcagttgatgattctatccaaatcaaagttgactacgctggatcatttggtgatgctgctaaaggtaaaacaattgccgcag
ctcaatatgcaggtggtgctgacgttatttatcaagccgctggtggtactggagcaggtgtcttcaatgaagctaaagctgtaaatgagaaa
aaagatgaagctgataaagtttgggtaatcggtgtagaccgtgaccaaaaagaggaaggtaaatacacttcaaaagacggtaaagaatc
taactttgttctagcatcttcaattaaacaagttggtaaatctgtacaactgattaacaaacttgttactgataaaaaattccctggtggaaa
aacaactgtttatggattaaaagatggtggtgttgatattgcaacaacaaaccttctgatgatgctataaaagctgttaaagaagctaaag
aaaaaattatttctggcgatgtaaaagttcctgaaaaataa

MNKKFIGLGLASVAILSLAACGNRGASKSDSKDAKTDLKAAIVTDTGGVDDKSFNQSAWEGL
EAWGKENGLKKGAGFDYFQSNSESEYATNLDTAVSSGYNVVYGIGFALKDAIDKAAGDNSDV
NYIIVDDVIEGKDNVASVTFADNEAAYLAGIAAAKTTKTKVVGFVGGMEGTVITRFEKGFEAG
VKSVDDSIQIKVDYAGSFGDAAKGKTIAAAQYAGGADVIYQAAGGTGAGVFNEAKAVNEKKD
EADKVWVIGVDRDQKEEGKYTSKDGKESNFVLASSIKQVGKSVQLINKLVTDKKFPGGKTTV
YGLKDGGVDIATTNLSDDAIKAVKEAKEKIISGDVKVPEK

SEQ ID 41

atgaaaaaattacttgtcacattagtgttgattttcagcacattatcattgattgcttgttcatcacaaagcacaaagcaagaagatcataaa
acaaaactatcacaaatgccaaagatctctggttttacctataaagggaaggtaccagaaaaccctaaaagagtagttagtttatcttcaac
ctacaccggttatttggcaaagctcgatatcccactagttggaatcacttcttatgatcacaaaaatcccgtcttaaagaaatacatcaagga
tgctaaagttgtctctgcaaccgacctagaaagcattacggccttggaacctgatttaattattgtgggttcaaatgaagaaaatatcagtca
attagctgaaatcgctcccttatttccattgaatacgcaaacatgactatttacaggtattctcagattttggtaaagtctttaacaaaacca
aagaaaccgacaaatggttacaggaatggaaaacaaaaacagcttcttttgaaagtgacgttaaagcagttacaggtaataatgctacct
ttaccataatgggattatatgagaaagatatctatcttttcggtaaagattggggtcgtggtggtgaaatcattcaccaagccttccaatatc
aagctccagaaaaagtaaaaatggaggttttcccaaaaggctatttgtccatttcacaagaagttcttccagattatattggtgattatgtcg
ttgtcgctgcagaggatgaaaaaacaggttcttctctttatgaaagtgaccttggaaaaatataccagccgttcaaaaaaatcatgtcata
aatgttaatgcgaataccttttatttcactgaccctctgtcattagagtatgaattaaaaaccttaacggatgctatcttgactcagaaaactc
acaac

MKKLLVTLVLIFSTLSLIACSSQSTKQEDHKTKLSQMPKISGFTYKGKVPENPKRVVSLSSTYT
GYLAKLDIPLVGITSYDHKNPVLKKYIKDAKVVSATDLESITALEPDLIIVGSNEENISQLAEIAP
LISIEYRKHDYLQVFSDFGKVFNKTKETDKWLQEWKTKTASFESDVKAVTGNNATFTIMGLY
EKDIYLFGKDWGRGGEIIHQAFQYQAPEKVKMEVFPKGYLSISQEVLPDYIGDYVVVAAEDEK
TGSSLYESDLWKNIPAVQKNHVINVNANTFYFTDPLSLEYELKTLTDAILTQKTHN

SEQ ID 48

atgaacaagaaatttattggtcttggtttagcttcagtagctatattaagtttagctgcatgtggcaaccgtggtgcttcaaaatctgatagca
aagatgctaaaacagatttaaaagctgctattgttactgatacaggtggtgttgatgataaatcatttaaccaatctgcttgggaaggtttac
aagcttggggtaaagaaaatgggcttaaaaaaggtgctggtttcgactacttccaatcaaatagtgaatcagaatatgctactaatcttgac
actgctgtctcaagtggttataacgtagtatatggaatcggatttgcccttaaagatgcaattgataaagctgctggtgacaatagtgatgtt
aactatgttatcgttgacgatgtcatcgaaggaaaagacaatgttgcaagtgtaacttttgcggataacgaagctgcttatcttgctggtatt
gctgcagctaaaactacaaaaactaaagtagtaggtttgtaggtggtatggaaggtactgttatcactcgttttgaaaaaggttttgaggc
gggagtgaaatcagttgatgattctatccaaatcaaagttgactacgctggatcatttggtgatgctgctaaaggtaaaacaattgccgcag
ctcaatatgcaggtggtgctgacgttatttatcaagccgctggtggtactggagcaggtgtcttcaatgaagctaaagctgtaaatgagaaa
aaagatgaagctgataaagtttgggtaatcggtgtagaccgtgaccaaaaagaggaaggtaaatacacttcaaaagacggtaaagaatc
taactttgttctagcatcttcaattaaacaagttggtaaatctgtacaactgattaacaaacttgttactgataaaaaattccctggtggaaa
aacaactgtttatggattaaaagatggtggtgttgatattgcaacaacaaacctttctgatgatgctataaaagctgttaaagaagctaaag
aaaaaattatttctggcgatgtaaaagttcctgaaaaataa

MNKKFIGLGLASVAILSLAACGNRGASKSDSKDAKTDLKAAIVTDTGGVDDKSFNQSAWEGL
QAWGKENGLKKGAGFDYFQSNSESEYATNLDTAVSSGYNVVYGIGFALKDAIDKAAGDNSDV
NYVIVDDVIEGKDNVASVTFADNEAAYLAGIAAAKTTKTKVVGFVGGMEGTVITRFEKGFEAG
VKSVDDSIQIKVDYAGSFGDAAKGKTIAAAQYAGGADVIYQAAGGTGAGVFNEAKAVNEKKD
EADKVWVIGVDRDQKEEGKYTSKDGKESNFVLASSIKQVGKSVQLINKLVTDKKFPGGKTTV
YGLKDGGVDIATTNLSDDAIKAVKEAKEKIISGDVKVPEK.

SEQ ID 49

atgaataaaaaattaacatcccttgccttattatcagctgctattatcccattagcggcatgttctcataaaggccaaaaatctgcttctttatc
agatttaaaagtagccatgattactgaccaaggggtgttgatgataaatcctttaaccaatcagcttgggaaggtctacaagcttggggca
aatcaaaaaatttgaaaaaaggaagtgattttaattatttccaatcaaccaatgaatcagaatatgtgacaaaccttgatactgcaaagtc
aaatggttttaatgtcatctttggtattggctttaacctgactgattctattaaaaaagcgtcttctgataacgcagatacaaaatacgctatt
gtcgatgatgtcattgaaggaaaagacaatgttgcaagtatcactttgccgacaacgaagcagcttacttagctggtgttgcggctgctaa
aaccagcaaaagcaaacaagttggttttgtaggtggtatggaaggaaccgttgttaaacgttttgaaaaaggctttgaagcaggtgttaaa
tcagttgatccttctatcaaagtatcaatcgcttacgcagggtcatttgcggatgctgctaaaggaaaatcaattgcagcaacacaatatgca
agtggtgctgatgtcatctatcaagcagcaggtggaacgggtgctggtgtcttcaacgaagccaaagctattaatgaaaaacgtgccgcttc
agataaagtttgggtccttggtgtagaccgtgaccaaaaagctgaaggtgaatacactgataaagatggtcaaaaaggaaacttgtcctt
gcttcaagtatcaaagaagttggtaaaaccatgcaaaaagtcattggtatgactgaaaaaggtgacttccctggtggtaaagtcaatacctt
tggtttaaaagaatcaggtgttaacctcaccacaaaagatcttccagaagatgttaaaaaagcagttgaaacagcacgccaagacattatc
tcaggtaaaatcaaagtcccagaaaaa

MNKKLTSLALLSAAIIPLAACSHKGQKSASLSDLKVAMITDQGGVDDKSFNQSAWEGLQAWG
KSKNLKKGSDFNYFQSTNESEYVTNLDTAKSNGFNVIFGIGFNLTDSIKKASSDNADTKYAIV
DDVIEGKDNVASITFADNEAAYLAGVAAAKTSKSKQVGFVGGMEGTVVKRFEKGFEAGVKSV
DPSIKVSIAYAGSFADAAKGKSIAATQYASGADVIYQAAGGTGAGVFNEAKAINEKRAASDKV
WVLGVDRDQKAEGEYTDKDGQKGNFVLASSIKEVGKTMQKVIGMTEKGDFPGGKVNTFGLK
ESGVNLTTKDLPEDVKKAVETARQDIISGKIKVPEK

SEQ ID 50

atgacagtagcacaaaaatctacatttaagcgcttcggcctaggagctgtaacacttgcttcagcagccctattgatggcttgtggtaacaag
acagcagcaaaaaatgataacaaaaatgagattaactggtacacaccaacagaactcatcactttagacatttcaaaaaatactgacactt
attctggtcttgcaatcggtaactcagaaagtaacttacttcgtgttgacggaaaagggaaattgcaaccagacttagctaaaaaagtaga
agtttcagaagatggtttaacttatactgcaaccttgagagatggtttgaaatggtctgacggaagtgaattaacagcagaggactttgttt
acacttggaaacgtattgtagacccagcaactgcttcagaatatgcttacttagcaactgaatcacatttattaaatgctgaagatattaata
caggtaaaaacactgatttaaattctcttggtgttaaagccgaaggcaacaaagttatctttacattgagtgcacctgctcctcaattcaaga
gcttattgtcatttgctaacttcatgcctcaaaaagaagaatttgttactaaaacaggaaaagactatggtacttcttctgaaaaacaaattt
attctggtccatacattgtaaaagattggaatggtacaagtggttcattcaaattagttaagaatgacaaatattgggatgctaaaaacgtt
aaaatgaaaactattaacgttcaaacagttaaaaaaccagatacagccgttcaaatgtataaacaaggaaaacttgattatgcaaacatt
tcaggaacatctgctatatacaatgcaaacaaaaacaacaaagacgttgttcccgtattagaagcaacaactgcttatatggtatacaatca
aacaggttctgtaccagcattgagcaacctaagattcgtcaagcattgaatttagcaacagaccgtaaaggaattgtgtctgcagcagtgg
atactggttctaaaccagcaacagcaattgctcctactggacttgcaaaacttaaagatggatctgatttaactaaatttgtagctcctggtta
taaatatgatgaaaaagaagcaggaaaacttttcaaagaaggacttgctgaactcggaaaagattctcttaaaattacaattaccgctgat
gcg
gatgcaccagcagctaaatcttcagttgactacattaaagaaacttgggaaaaagctttaccaggattaacagttgaagaaaaatttgttcc
atttaaacaacgtttagaagatacaaaaaatcaaaacttgaagttgctgtagcactttggggtggtgactatccagaaggatcaacttttct
atggtttgtttaaatcaggttctgcatataactacggtaaattcaccaatgcaaaatttgatgctgcttatgaaaaagctttaacaaccgatg
cattagatacagacgccgcagctaatgattataaagaagcagaaaaagctctttatgatgaagcaaactataacccactttacttccgtagc
ggagaaggattacaaaatccaagtattaaaggttaattcgtaattcaacaggtcttaatgttgacttacctatgcttataaaaaa

MTVAQKSTFKRFGLGAVTLASAALLMACGNKTAAKNDNKNEINWYTPTELITLDISKNTDTY
SGLAIGNSESNLLRVDGKGKLQPDLAKKVEVSEDGLTYTATLRDGLKWSDGSELTAEDFVYT
WKRIVDPATASEYAYLATESHLLNAEDINTGKNTDLNSLGVKAEGNKVIFTLSAPAPQFKSLL
SFANFMPQKEEFVTKTGKDYGTSSEKQIYSGPYIVKDWNGTSGSFKLVKNDKYWDAKNVKM
KTINVQTVKKPDTAVQMYKQGKLDYANISGTSAIYNANKNNKDVVPVLEATTAYMVYNQTGS
VPALSNLKIRQALNLATDRKGIVSAAVDTGSKPATAIAPTGLAKLKDGSDLTKFVAPGYKYDE
KEAGKLFKEGLAELGKDSLKITITADADAPAAKSSVDYIKETWEKALPGLTVEEKFVPFKQRL
EDTKNQNFEVAVALWGGDYPEGSTFYGLFKSGSAYNYGKFTNAKFDAAYEKALTTDALDTD
AAANDYKEAEKALYDEANYNPLYFRSGEGLQNPSIKGLIRNSTGLNVDFTYAYKK

SEQ ID 54

atgaaaaaatggtttttaatattaatgctttgggaatatttggttgtgctactcaaccatcaaaggttgcagcaataaccggttatgattccg
actactacgctagatatattgatcccgatgaaaataaaataacatttgccataaatgttgatggttttgtcgaaggtagtaatcaagaaatc
cttattagaggaattcatcatgttttaacagatcaaaaccaaaagattgttacaaaggccgagttgttagacgctattagacatcaaatggt
tcttctacaattggattattcctatgaactagtcgactttgcgcctgatgcacaattattaacacaagatcgacggcttttatttgccaatcaaa
attttgaggaatccgtatcacttgaagatactattcaagaatacctttaaaagggcatgttattctcagaaaacgggttgaagaacctatca
ctcatcctactgagactgctaatattgagtataaagttcaattcgcgactaaagatgcggaattccacccactacctatttttgtagactacgg
agaaaaacatattggagaaaaattaacctctgacgagtttcgaaaaattgcagaagaaaagcttttgcaactctaccctgactatatgatt
gatcaaaaagaatatactatcattaaacacaattctcttggtcaacttccaagatattattcttatcaagatcatttcagctacgaaattcaag
ataggcaacgtatcatggctaaggacccaaaatccggaaaagaactcggtgaaactcaaagtattgataatgttttgagaaataccttat
taccaaaaaaagttataaacct

MKKWFLILMLLGIFGCATQPSKVAAITGYDSDYYARYIDPDENKITFAINVDGFVEGSNQEILI
RGIHHVLTDQNQKIVTKAELLDAIRHQMVLLQLDYSYELVDFAPDAQLLTQDRRLLFANQNF
EESVSLEDTIQEYLLKGHVILRKRVEEPITHPTETANIEYKVQFATKDGEFHPLPIFVDYGEKH
IGEKLTSDEFRKIAEEKLLQLYPDYMIDQKEYTIIKHNSLGQLPRYYSYQDHFSYEIQDRQRIM
AKDPKSGKELGETQSIDNVFEKYLITKKSYKP

SEQ ID 63

atggaattcgaaaacacaaaatctaatcagattaaaacaacacttgctttaacgtcaacactcgcacttcttggaactggtgttggtatggg
acataccgttaatgcggatgacatgacaactgctgatcaatcacctaaattacaaggtgaagaagcaacattggcgcctacaaacattgaa
gatactaaagcagccattgatattaaaacagctacattagcagaacaaaccgatgctcttaatactgtaaatgagacaatcacaagcacaa
atgaagaattagctactttagaaggaggcttagctgataaagaaacagcagttgcagatgctgaaaaaacattggagtctgtttcaaatgc
ctcagaagaagaatttaatcaattagcagaacaaaataaagctgacttagctaaaactcaagaggagctaaaacttgctgaagcaacaa
aagaagaagttgcaacacaggtattgacacaatctgacgaggtaacagctgcagctaatgaagctaaaaaaatggctgaaaaagttgca
caagcagagacaaaagtttcagacttgacgaaaatggtcaatcaaccagaagcaataacagctcaagttgaaatagaacaaaacaatgt
caaaatcatttcggaagatttagcaaaagccaaaactgatttagttgctgtaacagataatacaaaaacacaattagcaaatgatttagcg
actgctcaatctagcttaagtgccaaacaaaatgaattagctaaagtacagtcacaaacaagtaatgtcgcagtgaatgttatgggtgcta
ataaaatggttgctccaactaattacccaattaatgaaatcaaaaaattaatgtcaagtggttacattgggacacaatcttatctaaataca
ttctatgctttaaaagatcaactggtttctaaagcagaagttgggcatacttaaatcattacgttgatatcgcaagtgacttaaaccgtatcg
ttaacccagataacttatcagttgaggttcaaaatgaattggctgtatttgcagcaacattgattaattctgttcgtcaacaatttggtctttct
gcagtcgaagtgacgcaaggtgctcaagagtttgctcgcactttgactcgaaactataaagtaacacatggaaacactgttccttttcttaat
tacaatcaacct
ggcaagaatggtcatataggcattggtccacacgatagaacaattatcgaacaagcagctacaagtgttggcttaaaagctaatgatgata
atatgtatgaaaacatcggattctttgatgatgttcatactgttaatggtatcaaacgtagtatttataacagtattaagtacatgctgtttac
agacttcacctatggaaatacatttggacatacggttaacttgttgcgttctgataaaacaaacccaagtgctccggtctatttaggagtttca
acagaaactgttggtggtttaaatacccactatgttatcttcccggcaagcaatattgtaaatgccagccaattcagcaaacaagtggtttca
ggtccattaacaacagttgataacagtgctaaaattagcactcttcaagcaagtattacttctgttgagtctaaaattcaaaccttacaaaaa
cgtattgcaaatatttcttcagaagcactagttgtctctgcacagagaaaagtagatggtttagctgcaaaacttcaaaaagctgaatctaa
cgttgaaaaagcaaaagctcaacttcaacagttacaagattcaaaagaagatttacataaacaacttgctttttcccttcaactcgtaagg
atttaaaaggtcaacttgacgaatcgcttgttcacctaaatcagtctaaaattcttttacatagcttagaagaaaaacaaagtcaagtggca
agtcaaattaacgtcttgacattgaagaaggcacaacttgaaaaagaactagcctttaactctcatccaaatcgtgaaaaagttgcaaaag
aaaaagttgaagaggctcaaaaagcattaacagaaaccttatctcaaattaaaactaaaaaagctatcttaaatgatttaacacaagaaa
aagcaaaattgacgtcagcaatcacaacaactgaacaacaaattgttttgttgaagaatcatttagcaaatcaagtggcgaatgctccaaa
aatcagcagtattgtccaaagatcagaaaacaatagagtaagacctgatgtttctgatacaagagagaaggcagtagatactgctcaaga
agcgacaattcttgctcaagcagaaacaatggctgaagaagtcattacaaattctgcaaaagccattgttgcaaatgctcaaaatgttgcac
aagag
attatgaaagtagcacctgaagtaacacctgatcaaggagttgttgcaaaagttgcagataatattaagaaaaataatgccccagcaagt
aaatcatatggtgcaagttcatcaacggtaggaaatgctacttcttcacgagatgaaagtacaaaacgtgctttaagagcaggaattgttat
gctggcagcagcaggacttactggttacaaactcagaagagatggcaaaaaataa

MEFENTKSNQIKTTLALTSTLALLGTGVGMGHTVNADDMTTADQSPKLQGEEATLAPTNIED
TKAAIDIKTATLAEQTDALNTVNETITSTNEELATLEGGLADKETAVADAEKTLESVSNASEEE
FNQLAEQNKADLAKTQEELKLAEATKEEVATQVLTQSDEVTAAANEAKKMAEKVAQAETKV
SDLTKMVNQPEAITAQVEIEQNNVKIISEDLAKAKTDLVAVTDNTKTQLANDLATAQSSLSAK
QNELAKVQSQTSNVAVNVMGANKMVAPTNYPINEIKKLMSSGYIGTQSYLNTFYALKDQLVS
KAEVGAYLNHYVDIASDLNRIVNPDNLSVEVQNELAVFAATLINSVRQQFGLSAVEVTQGAQE
FARTLTRNYKVTHGNTVPFFNYNQPGKNGHIGIGPHDRTIIEQAATSVGLKANDDNMYENIGF
FDDVHTVNGIKRSIYNSIKYMLFTDFTYGNTFGHTVNLLRSDKTNPSAPVYLGVSTETVGGLN
THYVIFPASNIVNASQFSKQVVSGPLTTVDNSAKISTLQASITSVESKIQTLQKRIANISSEALVV
SAQRKVDGLAAKLQKAESNVEKAKAQLQQLQDSKEDLHKQLAFSLSTRKDLKGQLDESLVH
LNQSKILLHSLEEKQSQVASQINVLTLKKAQLEKELAFNSHPNREKVAKEKVEEAQKALTETL
SQIKTKKAILNDLTQEKAKLTSAITTTEQQIVLLKNHLANQVANAPKISSIVQRSENNRVRPDV
SDTREKAVDTAQEATILAQAETMAEEVITNSAKAIVANAQNVAQEIMKVAPEVTPDQGVVAKV
ADNIKKNNAPASKSYGASSSTVGNATSSRDESTKRALRAGIVMLAAAGLTGYKLRRDGKK

SEQ ID 64

atgaaaaaattattagcttgtatgttaatggtctttttctatctcctatttctgttattagtactgaaaaatctatatcatttccaagtacaacc
attcatcaattgtctcaaaacgtgctaacttctagtacgtattttaatgcaattcctaaaaatccaaatgtctacgatgagcttcaaacatata
gtgatcaatctttaacaattccaagtggagttcttaaaccaaatgatgattttataatcaataatctttttgttaaatcaaaataatttaccaat
ttttcaattagcaaatggacaatttatttttggcaaataaaaagttcatttatgaagacgaaacaactaatcaaaccaatctcaatagttggtt
gtggctacaaaaagattttacaatctatgaagaacctcttgtaaaaggagttttacctattaatagtgatttaaaaccttattcaaaagttca
tgttacaaaactatcacaaacacagcatggaaatttttattatattgaaaacaaaggttgggtttctgagaaatatctctcaaaagctgata
acagaatggtaaaagttcaagaaatgctgagtcaaaaatataataaagaaaattattctatttttgttaaacaattaacaacacagacaa
gtgcaggaatcaatgccgataaattaatgtatctctgcaagtattgctaaattagcaaccttatactatgttcaaaataagattgaaactggta
aaacttctcttaatcagaccttaaaatatactgatcaagtaaaccattttaaaggtgactatgatccatcagggagtggtaaacttccaaaa
acgtcagataatgagaattatactgttgatgatttattaaaagcagttgcccagcattctgataatgttgctacaaatatacttggctattatc
tagctaatcaatatgatagagatttctctactcaaatgacagctatttctggtattaattgggatatggaagaacggatgttatcttcaaaag
cagcagcaaatgtaatggaatctatttactatcaaaatggacctattgtttcttatttaacaaatactgattttgacaatcaacgtatttctaa
aaatattgctgtaccagtagctcataaaattggtgatgcctatgattataaacatgatgttgcaatagtttatagtgactcg
ccattcattctatcgatttttagtgagaacgcatcctatgatgatattactgcaatcgccgatggtatttattctatattgaaa

MKKLLACMLMVFFLSPISVISTEKSISFPSTTIHQLSQNVLTSSTYFNAIPKNPNVYDELQTYSD
QSLTIPSGVLKPNDDFIINNLLLNQNNLPIFQLANGQFILANKKFIYEDETTNQTNLNSWLWL
QKDFTIYEEPLVKGVLPINSDLKPYSKVHVTKLSQTQHGNFYYIENKGWVSEKYLSKADNRM
VKVQEMLSQKYNKENYSIFVKQLTTQTSAGINADKLMYSASIAKLATLYYVQNKIETGKTSLN
QTLKYTDQVNHFKGDYDPSGSGKLPKTSDNENYTVDDLLKAVAQHSDNVATNILGYYLANQY
DRDFSTQMTAISGINWDMEERMLSSKAAANVMESIYYQNGPIVSYLTNTDFDNQRISKNIAVP
VAHKIGDAYDYKHDVAIVYSDSPFILSIFSENASYDDITAIADGIYSILK

SEQ ID 68

atgattagaaaagaaaattttaaaaaacgttatattagctttggaattttgggatttgcagtggcattgttagctcttgtttttgctttttcaag
taagaaagtagatacagaatcatatgctaaaaaatcagaatctaaagttgttaaaaatgtaacaaaatcacaatcaacatcatcttcaact
caaaaagttgaagcatcaacagaacaaagttcttcaagtcaagaacaagctacacctgatacttcagtggctactcaatcagtacctgtag
aacaggttgctcaaccaacaccgacaccttcaactgaggttgcacaacaggttgtaccagctcagcctagtgttccaacaactcaatatgctg
caactccagtaacttattatcaatcaaatggaaatactgccggagctattggtagtcaggctgctgctcaaatggctgcagcaacaggtgttc
ctcaatcaacttgggaagctattattgctcgcgaatcaaacggtaacccatatgtaagtaatgcatctggtgcctctggtttgtttcaaacaat
gccaggatgggttcaactgcaactgtacaagatcaaatcaattctgctatttcagcatataatgcacaaggcttatcagcttgggttatta
a

MIRKENFKKRYISFGILGFAVALLALVFAFSSKKVDTESYAKKSESKVVKNVTKSQSTSSSTQK
VEASTEQSSSSQEQATPDTSVATQSVPVEQVAQPTPTPSTEVAQQVVPAQPSVPTTQYAATPVT
YYQSNGNTAGAIGSQAAAQMAAATGVPQSTWEAIIARESNGNPYVSNASGASGLFQTMPGWG
STATVQDQINSAISAYNAQGLSAWGY

SEQ ID 70

atgaaatcatttttaatagtcggatttggcttggacttgtttcggtgtttttgctattgtcctcttttaacagcagcttcaaatagttatcgaa
actctgcaaaccaagcatacagcccaatcgaaacctatacccacaacctatcagatgttcctatcgatatcaaatatgacagcgacaagtac
tttatcagtgagtacttcctacgggcacaagtctatttgacctcaaccaaccgggttaaactggattccgaggttaacactgataccegtaatt
ttaaaatcgtcgcagacttaacagatagcaagcctggaaaagcaactgttcctcttaaagtcaataacctaccttctggcgtggcagccaaa
gtgaccccagataaaatgaccatcaccatcggcaagaaagcacgtaagacctttaatgtcgtaggaagtgtcgatccaaaacaagtggca
acaggttatgaattgctctcaatggacacaggcattgacaaagttgaagtgaccagtgacgagtctaagattgatttgattgatcatgtcgtt
gccaaactacctgacgatgttaaattaaatgcagactaccgaggagaagtgactcttcaagcagtctcagcagatggaacggttttagcca
gctccatttcaccagccaaaacgaccttatcggtttcagtcaaaaaaatcaccaagtctgttccaataagagtttcaatggtaggaaccatgg
atgaaagcttggcggatattcagccaaaacttggaaaagaaacagctgtcatttcagggccaagagaagttctggataccattaatgaagt
ggtagcggaagtcaatattagtggtgtgactaaagatacggaaaaaacggttagcctccattcggatattgtatccattgaaccttcttccgt
gccggttcagttgacaaccaaaaagaaa

MKSFFNSRIWLGLVSVFFAIVLFLTAASNSYRNSANQAYSPIETVTHNLSDVPIDIKYDSDKYFI
SEYSYGAQVYLTSTNRVKLDSEVNTDTRNFKIVADLTDSKPGKATVPLKVNNLPSGVAAKVTP
DKMTITIGKKARKTFNVVGSVDPKQVATGYELLSMDTGIDKVEVTSDESKIDLIDHVVAKLPD
DVKLNADYRGEVTLQAVSADGTVLASSISPAKTTLSVSVKKITKSVPIRVSMVGTMDESLADIQ
PKLGKETAVISGPREVLDTINEVVAEVNISGVTKDTEKTVSLHSDIVSIEPSSVPVQLTTKKK

SEQ ID 75

atgaagccatcaaatacggaaaaactatttctcattttgagtcttttaacattaattcttgcaggtagtttttatttattctttgcaagaaacca
tatcggaaacgccttaacacaaaaagaaacacaaacagttcaaaaaagtaatatgttaagcaaggccattgacgccctagaaaaagctg
agaaaaatccaagtcttgaagcaattgaaaaagctgagaaagccattaatcagttgaaaaaaactgatactaagttacgtctccaagagc
gactaaatcaactaaaaaaagctttctccattgaaaaggaagccattaaagcacttgaggaggctgaaaaaaatcctagtcttgaaacca
aagacaaagctaaagaagccattgataaaattggaaatctcaccaaaaaaaatgagctcttaaatcgattaggagcaattgtcatttcag
atcaagcacctgaatcaagctccacatcgtcagaagctgcaagtgacacgactataagtgatgcaaacacaggaaatgcagaacaagcaa
ccatttatgaaagtccggttgcaccagctgaaagctatgttcctcaagcccccgctcaaagtgttggagaacctgtccaacccgcaacaccaa
gtactcctgcgccaagccctgaggctccaagtactcctccaactgttcctgcgacagataccccaagtgaatcaaccccctaatcca

MKPSNTEKLFLILSLLTLILAGSFYLFFARNHIGNALTQKETQTVQKSNMLSKAIDALEKAEKN
PSLEAIEKAEKAINQLKKTDTKLRLQERLNQLKKAFSIEKEAIKALEEAEKNPSLETKDKAKE
AIDKIGNLTKKNELLNRLGAIVISDQAPESSSTSSEAASDTTISDANTGNAEQATIYESPVAPAE
SYVPQAPAQSVGEPVQPATPSTPAPSPEAPSTPPTVPATDTPSESTPNP

SEQ ID 81

atgaagaaaaaaacacttgtcatgatgggattggcaggactagtagcaggcggtcaactctatcaagccaaagcagttttagcagaccaa
gaaaaactcaaagtggtaaccacttttatcctgtttatgaatttacaaaaggtgtggtaggtaaagagggagatgtttccatgctgatgaa
ggctggaactgagccacatgactttgaaccctcaacaaaagacattaaaaaaatacaagattcgcaagcctttatttatatggatgacaac
atggaaacttggattccagaagtgaaaaaagctattaagtcgaaaaaagtagcctatattgaaggtactggcgacatgttattagcagctg
gaacggaagaaggtcacgatcatgaaggagaagatgatcatcatcatgatggtgaagacaaacatggtcatgaagaacatagtcataaa
tttgatccacatgtttggttatctccatatcgcagtatttctgtcgttgaacatatacgtgattcacttctaaaaaatatccagaaaaagcaga
aaagtttaatgccaacgctcaagcctatattgaaaaattgaaaaagcttgattcggaatatacagaaactttatcatctgctaaacagaag
agttttgtgacgcaacacgcggcatttggatatatggcattggattatggcttgaatcaggttgctattaatggtatctcagcagagagtgaa
ccatcagctaagcgtattgctgaattgtctaaatatgttaaaaaatatgatattaactatatctatttgaagaaaatgcttcaaataaagta
gctaagactcttgcaaatgaagcaggtgtcaaagctgttgttttaagccctcttgaaggtttgacccaaaaagaaatggataagggagaag
attacttctctgtcatgcgtgataatttaaaagccttcagttgacaaccgaacgcgaaggtaaggaaattgacccagaagaagatgcaagt
aaatctgtttataatggttatttcaaagattctgaagtcaaagaccgtaaattaagcgattggtctggtgattggcagtccgtatatccatact
tacaagatggtaccttgatcaggttatggattacaaagctaaaaagtctaaaggtgaaaaatctgcgaaagaattcaaagactattacg
aaacaggt
tataaaacagatgtcaacaagattcaaattgatggcaaaaagaaaaccatcacctttgaaagaaatggggacaagaaaacctttacttat
cagtactcaggcaagaaaatcttaacatatgaaaaaggaaaccgtggtgtccgttatatgtttgaaactaaggataaagatgcgggcgaa
ttcaaatacattcaatttagtgatcatggcattgctccgaaaaagcaggacatttccacatttattggggtgatcaaggacatgatgccatt
gcttcaaaatgggatcattggccaacttactatggttctgatttaagtggtcgtgaaattgcccaagaaatgaatgctcat

MKKKTLVMMGLAGLVAGGQLYQAKAVLADQEKLKVVTTFYPVYEFTKGVVGKEGDVSMLM
KAGTEPHDFEPSTKDIKKIQDSQAFIYMDDNMETWIPEVKKAIKSKKVAYIEGTGDMLLAAGT
EEGHDHEGEDDHHHDGEDKHGHEEHSHKFDPHVWLSPYRSISVVEHIRDSLSKKYPEKAEK
FNANAQAYIEKLKKLDSEYTETLSSAKQKSFVTQHAAFGYMALDYGLNQVAINGISAESEPSA
KRIAELSKYVKKYDINYIYFEENASNKVAKTLANEAGVKAVVLSPLEGLTQKEMDKGEDYFSV
MRDNLKALQLTTEREGKEIDPEEDASKSVYNGYFKDSEVKDRKLSDWSGDWQSVYPYLQDG
TLDQVMDYKAKKSKGEKSAKEFKDYYETGYKTDVNKIQIDGKKKTITFEERNGDKKTFTYQYS
GKKILTYEKGNRGVRYMFETKDKDAGEFKYIQFSDHGIAPEKAGHFHIYWGDQGHDAIASKW
DHWPTYYGSDLSGREIAQEMNAH

SEQ ID 92

atggcaaactacaaaaaaataacatctttatcacttttgacccttttatcacttgctacctttttcagcaactcaatattctaaagtctatgcaca
agatcctgagtcatcctcatcagtcaatattaaaaccattgatggtcagttagctattgctgacaaagaggcagagccattatacaaagaaa
tggatagtattcaaatgagtatagaaaaaattaaggcaagccgctttaaacctgctgaaatagctattacaacagaaattcaacaactgga
aaatcttaatgaaactctattagaaaagttttatcagaaaattggcaatcgtatctggaatactaaagaagaagcactcaatttaattagta
agacaactctttcaccttctgaaaaagagctattaaaggactactttaataaagatgaggtattgcaaaaaaaattaaaagaaaatgactt
actcattgatcaagagacagctcaatacaacgcaaaactggctatcctaactcagcaagctgataaaatttatgaaaaacacgggattacc
aaagatatcttggcagcttactatatgcaaacaggaatggaagcagattaa

MANYKKITSLSLLTLLSLATFSATQYSKVYAQDPESSSSVNIKTIDGQLAIADKEAEPLYKEMD
SIQMSIEKIKASRFKPAEIAITTEIQQLENLNETLLEKFYQKIGNRIWNTKEEALNLISKTTLSPS
EKELLKDYFNKDEVLQKKLKENDLLIDQETAQYNAKLAILTQQADKIYEKHGITKDILAAYYM
QTGMEAD

SEQ ID 93

ttgaaatctaaaaagtcttatgttttattattagcaccgtttgttctggcttcattttggcagtcaaagatggtgtctgcttcagaaatcgccaat
caaaacgtgacagttgattcaagtgcaaataataacatgtcatctaagttgtctacttcaaatttagatacaattccagaaagtacttctgaa
gtaactgttttggatcagtcgacaaatttagtaacagaaaatgtagtccaagaaaaggcgctagcatcatcagaaatacaaacagatgag
agtatcatagtatcatctccatcaggtgacctcagtgcttcagaagataacacactttctgaagggaatgctttatcagcagtaggggcagta
aaatctagttttcaatcagttaatactgatgtatcaagcaatctcaaaactgctaaacaggaaacggtcgtttctttagctgctcaagtagca
gagcccgtaactgcaactgtagatgacaaaggtattagcattcaatataatgaggcgattccacaagatacaagcattttatttgctgtctgg
ggtgataaacaagatcagaatgatttggtctggtataatgcatcatcaactggctatgcctatgttgatttttcacgccataaagaatatgga
ttataccatattcatacttatgcaaaacgcaatggcaatatgtatggaattagcgctcttcaagtcacactttgacaccacaaattactagtc
aaatcgctcaaaaggatgccaactctttcacaattacagtatccaatgtcccttctacaatcaccagtgttaagattccagtttggacagataa
agatgaccaaaatgatttgatttggtataatgcccgtcaagtgtcaaaaggaacctatcaagtactggtgaatacagctaatcataataatg
aaaaaggtctttatcacattcatatttatggctatagtacaattttgggtagtcagattggacttgcagccaaaaccttcaataatgtggata
gtcgcccaaatgctacagtatcagttgtaaattatgccgaaaacaaaaccaccttttaccgttaatgttgtcggttctacaaatacaaaagtat
taacaggtgttcaaatcgcagtatggtctgaaacaaatggtcaggatgatttaaaatggtataagcctcttgtttctgggaat
agtgctagtcaagtgattgatgttgctaatcatagtaataccagtgatcaatatattattcacgtttatacggattatactgatggaagtcgtg
ttggaacgaatttagggcctataaaattgttaaagaaattctgcctgtcgtaaaacctaacgtaacagttcaaaattaccaagctgacaag
gggttacttgaagtcaaggttcaggaaggtagtaaagcaatctcaaaaataagcgtagcagcatggtcgacttctaatcaaacaaatctcc
attggtatcaagaaattccaatagctggtcaagagacgattattaaagtcaatcaagcctaccatgatttttttagttggaaattacactgttc
atacttatattgattatacggacaagtcacgagatggcttcaatctaggaaattatgaatttcctgttaaagttggcctttctgcttcacaagg
aaattatgatattgtcaataaggtcatttacctagatgctggtcatggcggttatgatccaggagcagtttatttgggacatctgaaaaaac
cttgaatttgcaaatgcaaaccttggtaaaaagtaaattagaatctcaaggctacacagtcgtaactacaagaacagatgactcctttacag
atttgcttccacgttcggaaaaagcaaataacagtctttcagatctctttgttagcctccattttaatgcctctacaagttcgcaagcctctgga
attgaaacttattactatgaatactacgaagagtatcctcacgcattaatgagatttttcataatgatcctgaacgtttgagtcgaagtagtg
ttttagccgaagctattcaggcggcgaccactgctaaaactggcgctaaaaacaatggtgttttgagaaatacatttgcagtattaagagaa
acaacagccccagcagtgctagtagaattaggttacatgtcaaatgctagcgagttccaaaatattagcaatgtgaactatcaagaaaaat
tagcacaaggaattgtttcagggattttatcctattatcaaacctacagtgtt

MKSKKSYVLLLAPFVLASFWQSKMVSASEIANQNVTVDSSANNNMSSKLSTSNLDTIPESTSE
VTVLDQSTNLVTENVVQEKALASSEIQTDESIIVSSPSGDLSASEDNTLSEGNALSAVGAVKSSF
QSVNTDVSSNLKTAKQETVVSLAAQVAEPVTATVDDKGISIQYNEAIPQDTSILFAVWGDKQD
QNDLVWYNASSTGYAYVDFSRHKEYGLYHIHTYAKRNGNMYGISALQVTLLTPQITSQIAQKD
ANSFTITVSNVPSTITSVKIPVWTDKDDQNDLIWYNARQVSKGTYQVLVNTANHNNEKGLYHI
HIYGYSTILGSQIGLAAKTFNNVDSRPNATVSVVNYAENKTTFTVNVVGSTNTKVLTGVQIAV
WSETNGQDDLKWYKPLVSGNSASQVIDVANHSNTSDQYIIHVYTDYTDGSRVGTNLGAYKIV
KEILPVVKPNVTVQNYQADKGLLEVKVQEGSKAISKISVAAWSTSNQTNLHWYQEIPIAGQETI
IKVNQAYHDFLVGNYTVHTYIDYTDKSRDGFNLGNYEFPVKVGLSASQGNYDIVNKVIYLDAG
HGGYDPGAVYFGTSEKTLNLQMQTLVKSKLESQGYTVVTTRTDDSFTDLLPRSEKANNSLSD
LFVSLHFNASTSSQASGIETYYYEYYEEYPSRINEIFHNDPERLSRSSVLAEAIQAATTAKTGAK
NNGVLRNTFAVLRETTAPAVLVELGYMSNASEFQNISNVNYQEKLAQGIVSGILSYYQTYSV

SEQ ID 94

atgaaaaaaagaaagaataaatggaggttttttatgattaaaatgagaaaatcacagttgtcagtcagtcttgccctttttgccttactaact
tttgcggcttcacctatttatgccttacaaacgaatcaaaaccaagctgggcaagaagtccaacaagatagtcttgctgtcacggctcatttac
aagctcagaaacctcttttagatattgctattcagataccagctcaactggctaagggaggtcaagcaaaagtggaattgcttgatcaaaca
ggtcaggtcaaaaataccattagctatgacttgcaagcaggatggacacaaatgtcagcctggtttgacatgacaggttacccaagtggtg
attatagtgttaaggttacctacaatggcatcagccaacaatcatcacctattcactattaa

MKKRKNKWRFFMIKMRKSQLSVSLALFALLTFAASPIYALQTNQNQAGQEVQQDSLAVTAHL
QAQKPLLDIAIQIPAQLAKGGQAKVELLDQTGQVKNTISYDLQAGWTQMSAWFDMTGYPSGD
YSVKVTYNGISQQSSPIHY

SEQ ID 100

atgaataccaaaaaaataatgcaatttatacttgcaattaccgtgactctatttgcaactgtcggtatgaaaacggtagctgaaagtttttgg
gctgggcatcatgatattgaaatgattaatcgaaacatagacactttgtctaatcgcattaaaacaaaaaatcagaaaatttcagatttaaa
cgcaagcatttcaacttaaaatcagatattgcttctcaaaacagccaagtgagcgcactgcaacaacaattaatccaagctaatattgata
aacaaaatgagatcaatcaaaaaattaatgaaatcaacgctaaaattgcagaaggtaatcaaaaggttgccgaaaaacaacttgaagtg
gatgccgccaatcaaaaaatagcagaattgaatcaacaagtatcctcattacaagataaattgaatcaaaatgattctcaagcattaagag
atgttcaaaacactcgtcaaaaatctgataaagctgttttagaaacggaa

MNTKKIMQFILAITVTLFATVGMKTVAESFWAGHHDIEMINRNIDTLSNRIKTKNQKISDLNA
SISTLKSDIASQNSQVSALQQQLIQANIDKQNEINQKINEINAKIAEGNQKVAEKQLEVDAANQ
KIAELNQQVSSLQDKLNQNDSQALRDVQNTRQKSDKAVLETE

SEQ ID 105

atgaagaaaaaaacttatttatttgttgctggaatcactgtaacctgtggtactgcattggcgattcatttatcacaaccaaagtcaatacca
atgacaaaatcaggacatgagaaaatgatttcaaaatccccaactaatagtgatgataaatctaggaaaaaagataagggtattgctggt
attgattatcctactagtgatggatttaaactagataagcaatctaaaatcatttctaaaacagacacaggaattattgttgctcatggagat
cattctcactttatttttataaagatttgaaagggactgcatttgcatatttaataccaaatggcgttcaaataactaaaccttttaataggtg
atacaaatgaatcgataaatggacatgggcatcattatgttttcaatccaaaggatattgttgcagaagatgcttttggttatactgtcagac
atgatgatcatttccattatatttttaaaatctagtctaggaatgacccctatgttgaccaactataatcaaggccgtcatttccaaagggatag
tcattacaaacctaatgttcaaggaattccaggtcttgattttgctacctctgatggttttcaatttgatggtagcggaattgtaggtaaaaca
aatgatagtatttggttagtcacgatgaccatcttcatcccatttcgtttgatgatttaaggaaaacaggttggggagagatagtcaaaatt
tatgagaaaagagaaattgcaactccccttagtcatgtagcaagcaaggaggacttggttcaaaagaccatagaatatttagcgaaatcat
tggccttaccattatcatctattgaaataatcaaaactgacgatggtaaaattgggtttaaatatcctcatcatgatcatagccatgtcatcat
gttagaagatatcgaaatcggtaaaccaattccagatcctcatcaacttcatcatgccaaagaattggaaaagcatcgcattggcatgaata
cattaagggagatcggctttgatgaagaagtcattcttgatattgttagaacccatgatgcaaaaacagaatttccatcaaatgaaaaaaa
tccggaaaagatgaaggagtggttgaccacagttacaaaattggatttaggaagccgaaaagacccctgaatcgatttggacttcat
ttattacctaatctagagaatttaggaatcggctttacacctatcaaaaatatggagcctgttctacaatttaaaaaattaaaacgactgtta
atgacagcaactggtgttaaaaactatgattttctgaagtacatgccaaatcttgagggattagatatttcacaaaacaacttaaaggattt
gagcttttgacgccttataaacaactcaatctattagctgccgcagataaccaattatcaacattgcaaccattagcggaactgccaaagtt
acaatttttagtattaagtaataataagataaaagatttgagtccattgaaaaatttaacaaggcttcaagaagttcatattgagaacaatc
tggtcagagatttaacccctttaaatgacaaagaaaacttaaaagttttaaatctatccgaaaatagggagttgacttaaagactttgag
gttaccgcttcttgagacacttaccgtaaataaagcatctttgacggatttaaacttttttgaagctaatcctaacctgactgaagtaacagca
acaaaaaatgctattcagaaattagatggcattgagaaagcaaagaaattgcaatttttagatttgcaagaaaataaggttaatcatttaa
acattaaggaaaaacaagagtcactaactttcttgaatctttctgataatgcattggaatcgctcgaaggggtaaatgactttacagctttgg
agacattaagagtggcatcaaataaaatttcgagcttacaccttgaagaaagcaatcagcaagtaaaaagcttagatgtcagttataatca
attgccaaaggaggaattaacattaaatgaaaacgacataccccttggtgttgctcatcatttacagcggttaaggaagggtcaatagag
gggaatccctctctaaatgatgttttagaaagtcaaaatcaaaagaataataaaaaagaa

MKKKTYLFVAGITVTCGTALAIHLSQPKSIPMTKSGHEKMISKSPTNSDDKSRKKDKGIAGIDY
PTSDGFKLDKQSKIISKTDTGIIVAHGDHSHFIFYKDLKGTAFAYLIPNGVQITKPLIGDTNESI
NGHGHHYVFNPKDIVAEDAFGYTVRHDDHFHYILKSSLGMTPMLTNYNQGRHFQRDSHYKP
NVQGIPGLDFATSDGFQFDGSGIVGKTNDSILVSHDDHLHPISFDDLRKTGWGEIVKIYEKREI
ATPLSHVASKEDLVQKTIEYLAKSLALPLSSIEIIKTDDGKIGFKYPHHDHSHVIMLEDIEIGKPI
PDPHQLHHAKELEKHRIGMNTLREIGFDEEVILDIVRTHDAKTEFPSNEKNPEKMKEWLTTV
TKLDLGSRKDPLNRFGLHLLPNLENLGIGFTPIKNMEPVLQFKKLKRLLMTATGVKNYDFLK
YMPNLEGLDISQNNLKDLSFLTPYKQLNLLAAADNQLSTLQPLAELPKLQFLVLSNNKIKDLS
PLKNLTRLQEVHIENNLVRDLTPLNDKENLKVLNLSENRGVDLKTLRLPLLETLTVNKASLTD
LNFFEANPNLTEVTATKNAIQKLDGIEKAKKLQFLDLQENKVNHLNIKEKQESLTFLNLSDN
ALESLEGVNDFTALETLRVASNKISSLHLEESNQQVKSLDVSYNQLPKEELTLNENDIPLGVA
HHFTAVKEGSIEGNPSLNDVLESQNQKNNKKE

SEQ ID 109

atggcaattattttacctgaccttccatatgcatatgatgctcttgagccacaaattgataaagaaacaatgactcttcatcatgacaaacatc
atgcgacatatgttgctaatgccaatgctgcgcttgaaaaacatccagaaattggtgaagatttggtggcgttattatctgatgtgtcatcaa
ttccagaagatattcgtcaagctcttatcaataatggaggcggacatcttaaccatgcacttttttgggaacttctttcacctgagaaaaacaga
aatcacttcggaagtagcttctgctattgatgaagcatttggttcttttgatgcatttaaagaaaaatttacagcagcagcaacgggacgtttt
ggatctggttgggcttggttagttgtcaataaagaaggaaaacttgaagtaacttcaactgcaaaccaagatacaccaatttctgaaggta
aacagcctattttgggtcttgatgtatgggaacatgcttattacttaaattatcgtaatgtacgtccaaattacattaaagctttctttgaaatt
attaattggaaaaaggttgatgagctttataaagcagcaaaagcg

MAIILPDLPYAYDALEPQIDKETMTLHHDKHHATYVANANAALEKHPEIGEDLVALLSDVSSI
PEDIRQALINNGGGHLNHALFWELLSPEKTEITSEVASAIDEAFGSFDAFKEKFTAAATGRFGS
GWAWLVVNKEGKLEVTSTANQDTPISEGKQPILGLDVWEHAYYLNYRNVRPNYIKAFFEIIN
WKKVDELYKAAKA

SEQ ID 115

atgagaaaacattatgtttcaaaaagtgccatttttttagccatgttagttgcaacaggttcagctcaattcgtaaaagctgagacaccaaca
actacaactagcccagcaacaagtcttactgatgcctctgcaagtacgactccaacaacgaacacgacgtcaactgtgacacctgctcttgat
ccaaatactaatttcaccgttgattctagtgctacaacaagtactactactccaagtccagtggaggcagcagccatctctcctgtgatagcaa
ctgctcaacctacaactaatgtcactagtgctagccttgcgccagcagctaacacaatggcaacaactccagttgaaggccaaacagttgat
gtgcgcatcatctcaaccactgaccttcactctaacttagtcaactatgattactatcaagataaagcatctcaaactatcggtttagcgaaag
ctgccgttcttatcgatcaagcaaaagctgaaaatcctaatgctgttcttgttgataacggcgatatcttacaaggtacaccactcggaactta
tgaagcattgattgatcctttacaaccaggtgaagtgcacccaatgtacgcagcccttgataaacttggttttgacgcttcaactttaggtaac
cacgaattcaactatggccttaccttcatcgaaaatgccattgcttcagccggactaccaatcctaaatgctaacgtctttgatgcagcaacgg
gagaatacctttccaaccttacgctatcgttacgaaaagctttacggatgctaatggccaagctgtcgacctaaaaatcggtatcacaggta
ttgtgccacctcaaatcatgctttgggataaggctaacctcgaaggtaaagttacggtcaaagatgccgtgcaagctgtgacagaaatcatt
cctaccatcaaaaatgctggcgctgacatcgttttagtccttgcccacactggtatcggtgatgatgtttatgaaactggtgaagaaaatgtcg
gctaccagattgcaagtcttgctggtgttgacgcggtcgtaacaggtcactcacatgcagaattccottcaggacaagatacogggcttctacg
aatcctataatggtgtcgacgggtgtctggtttaattaacggaacacctgttaccatggcaggaaaatacggggatcat
atcggtattattgatttaaatgtgtcctatacaggtggtaaatggactgttaatcgcgataaaaaccatgcagaaatccgtaaaattgatac
caaatcaaccatcgccgatgctgatattttagctttggctcaagcatctcaccttggaacaattgattacgtgcgtcaaactgttggtgaaaca
actgcaccaattaacagttacttcgctttagtcaaagatgatccatctgttcaaattgtcaataatgcacaactttggtatgccaaacaacaat
tagctggtactccagaagctgacttacctcttctttcagcagcagcaccatttaaagctggtactcgtaatgacccaaccgcttatactgatatc
ccggctggaccaattgccattaaaaacgttgccgacctatacttatatgataatgtcactgctatcctaaaactgacaggtgcagatatcaaa
gaatggttagagatgtcagcaggacaatttaataccatcgacccaaatgtagctggacctcaaaacctagtcaatacggattatagaacttа
caactttgatgtgattgatggcgttacttacgagtttgatgtaacacaacctaacaagtatgatgccaaaggtaatcttcttaaccctaatgct
agtcgtgttcgtaaccttaaattccaaggtaaagaaatcgatccaaatcaagaattcatggttgtcactaataactaccgtgctagtggaagt
ttcccaggggtaaaaaatgcaaccattaatcgattgcttaaccttgaaaatcgacaagccatcatcaattatatcgtttctgaaaaaaccatt
aacccaagtgcagataacaactggtactttgcagataccattcaaggacttgatttacacttcttaagtgcagatacttctaagaatttaattg
gtgacaaagctgatatttcttataccgcccttctactattgaaggttttggtgacttcgtctttacatatgttaaaccagaattaccagtagcc
actccggaaacaccacaagaaactggtagccaattgactgaaaaccgtcgtcaagaaattcatcaattagctacgcgtgtttacaatcaaac
aaaagcgacatcatcaagtactactaaggctgaattaccaaaagctggtagccaagagtctaaaggtttattcttcatg
ggcttaagcttacttggtttagccggattaatcacgaaaaaagaagaaagacaa

MRKHYVSKSAIFLAMLVATGSAQFVKAETPTTTTSPATSLTDASASTTPTTNTTSTVTPALDPN
TNFTVDSSATTSTTTPSPVEAAAISPVIATAQPTTNVTSASLAPAANTMATTPVEGQTVDVRIIST
TDLHSNLVNYDYYQDKASQTIGLAKAAVLIDQAKAENPNAVLVDNGDILQGTPLGTYEALIDP
LQPGEVHPMYAALDKLGFDASTLGNHEFNYGLTFIENAIASAGLPILNANVFDAATGEYLFQP
YAIVTKSFTDANGQAVDLKIGITGIVPPQIMLWDKANLEGKVTVKDAVQAVTEIIPTIKNAGADI
VLVLAHTGIGDDVYETGEENVGYQIASLAGVDAVVTGHSHAEFPSGQDTGFYESYNGVDGVS
GLINGTPVTMAGKYGDHIGIIDLNVSVTGGKWTVNRDKNHAEIRKIDTKSTIADADILALAQAS
HLGTIDYVRQTVGETTAPINSYFALVKDDPSVQIVNNAQLWYAKQQLAGTPEADLPLLSAAAP
FKAGTRNDPTAYTDIPAGPIAIKNVADLYLYDNVTAILKLTGADIKEWLEMSAGQFNTIDPNVA
GPQNLVNTDYRTYNFDVIDGVTYEFDVTQPNKYDAKGNLLNPNASRVRNLKFQGKEIDPNQE
FMVVTNNYRASGSFPGVKNATINRLLNLENRQAIINYIVSEKTINPSADNNWYFADTIQGLDL
HFLSADTSKNLIGDKADISYTGPSTIEGFGDFVFTYVKPELPVATPETPQETGSQLTENRRQEI
HQLATRVYNQTKATSSSTTKAELPKAGSQESKGLFFMGLSLLGLAGLITKKEERQ

320

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/NL2008/050537

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/569 A61K39/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/37105 A (MEDIMMUNE INC [US]) 29 June 2000 (2000-06-29) pages 22-23,25 examples 3,4	1-65
X	ZHANG SHIZHEN ET AL: "Identification and characterization of an antigen I/II family protein produced by group A Streptococcus" INFECTION AND IMMUNITY, vol. 74, no. 7, July 2006 (2006-07), pages 4200-4213, XP002464092 ISSN: 0019-9567 * page 4204, right col. - page 4206, left col. * page 4209; table 3	1-65

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 October 2008	04/11/2008

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Lunter, Pim

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

3/21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NL2008/050537

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 37
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Article 53 (c) EPC - Method for treatment of the human or animal body by therapy

2. [X] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search reportcovers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 37

Article 53 (c) EPC - Method for treatment of the human or animal body by therapy

---

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: -

The present claims 13-65 encompass Streptococcus proteins, methods of producing said proteins, compositions comprising said proteins, uses of said proteins, nucleic acid molecules encoding these, cells comprising these, and methods for measuring said proteins, wherein the proteins are defined only by their desired function, contrary to the requirement of clarity in Article 84 EPC, because the "result-to-be-achieved" type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any protein could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not know beforehand whether it fell within the scope claimed, except for the proteins disclosed in the description that fulfil all of the conditions recited in claim 1 (table 5, nos. 17, 19, 20, 27, 28, 64, 68, 75, 81, 93, 100 and 105). Undue experimentation would be required to screen proteins randomly. Note that the application does not show that the other proteins listed in tables 5 and 6 are recognized by antisera from animals infected by different S. uberis strains.

The search of claims 13-65 was consequently restricted to the proteins recited above.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.2), should the problems which led to the Article 17(2)PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/NL2008/050537

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0037105 A	29-06-2000	AU 776828 B2	23-09-2004
		AU 2373100 A	12-07-2000
		CA 2355364 A1	29-06-2000
		EP 1140157 A2	10-10-2001
		JP 2002532561 T	02-10-2002
		US 2007065458 A1	22-03-2007

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:

22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad (31) ***Prioridad*** (32) ***Fecha*** (33) ***País***
07113844.0 **06/08/2007** **EP**

(51) Int Cl: **G01N 033/569**

(71)Solicitante(s) **BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH**

(72) Inventor(es) **HILDA ELIZABETH SMITH**

(74) Apoderado: **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 06/03/2010
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 05/08/2008
No. de solicitud PCT/NL2008/050537

(87) Publicación internacional
Fecha: 12/02/2009
N° publicación: ***WO 2009/020391 A1***

(54) Titulo: **PROTEÍNAS DE *STREPTOCOCCUS* INMUNOGÉNICAS**

Reivindicación(es):

1. Un método para identificar una proteína *Streptococcus* que es capaz de provocar una respuesta inmunológica contra por lo menos dos cepas y/o serotipos de *Streptococcus*, el método comprende:
a) identificar por lo menos parte de una proteína secretada, una proteína asociada a superficie y/o una proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano;
b) seleccionar por lo menos una proteína identificada en la etapa a) que se conserva sobre por lo menos dos cepas de *Streptococcus* y/o serotipos; y
c) determinar si por lo menos una proteína seleccionada en la etapa b) o una parte inmunogénica, derivado, y/o análogo de la misma es capaz de unir específicamente un anticuerpo y/o una célula inmunológica de un animal infectado mediante una primera cepa de *Streptococcus* y/o serotipo, y un anticuerpo y/o célula inmunológica de un animal infectado mediante una segunda cepa de *Streptococcus* y/o serotipo.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha proteína secretada y/o proteína asociada con superficie se identifica al identificar en por lo menos parte de la secuencia genómica del *Streptococcus* un gen que comprende un motivo de una proteína asociada con superficie y/o secretada.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano se identifica al identificar en por lo menos parte de la secuencia genómica del *Streptococcus* un gen que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un gen de factor de virulencia bacteriano.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o 3, en donde dicha proteína que tiene por lo menos 50% de identidad de secuencia con un factor de virulencia bacteriano se identifica al identificar por lo menos en parte de la secuencia genómica del *Streptococcus* un gen que hibrida con la secuencia de nucleótido de longitud completa de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico listadas en la Figura 4 a 65° C en un amortiguador que tiene 0.5 M de fosfato de sodio, 1 mM EDTA, y 7% de dodecil sulfato de sodio en un pH de 7.2,
en donde la molécula de ácido nucleico permanece hibridada después de lavar dos veces con un amortiguador que contiene 40 mM de fosfato de sodio (pH 7.2),
1 mM EDTA y 5% de dodecil sulfato de sodio durante 30 minutos a 65° C y; lavar dos veces con un amortiguador que contiene 40 mM de fosfato de sodio (pH 7.2), 1 mM EDTA y 1% dodecil fosfato de sodio durante 30 minutos a 65° C.

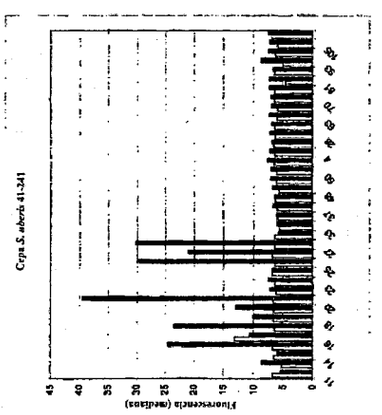
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, 3 o 4, que comprende adicionalmente seleccionar un gen que se conserva sobre por lo menos dos cepas de *Streptococcus* y/o serotipos.

6. Un método de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende adicionalmente obtener una proteína codificada mediante dicho gen, o una parte inmunogénica, derivado y/o análogo de dicha proteína.

7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde dicho gen se expresa en un sistema de expresión procariótico.

Fig. 1A

Análisis FACS en cepa *S. uberis* 41-241 intacta



Cepa *S. aberis* 41-241

Análisis FACS en cepa *S. aberis* 41-241 intacta

Fig. 1A

Fig. 1A

Análisis FACS en cepa *S. uberis* 41-241 intacta

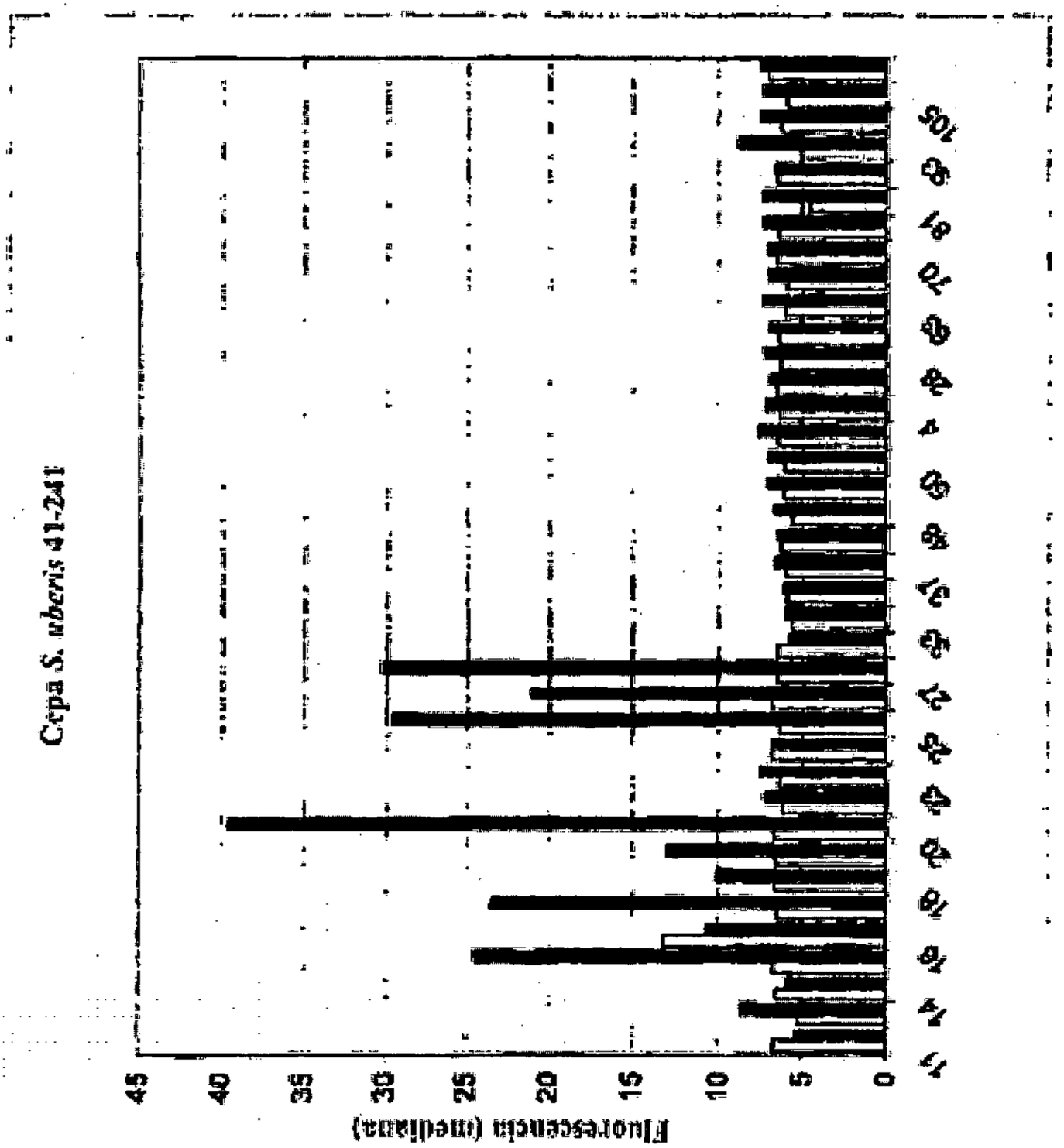
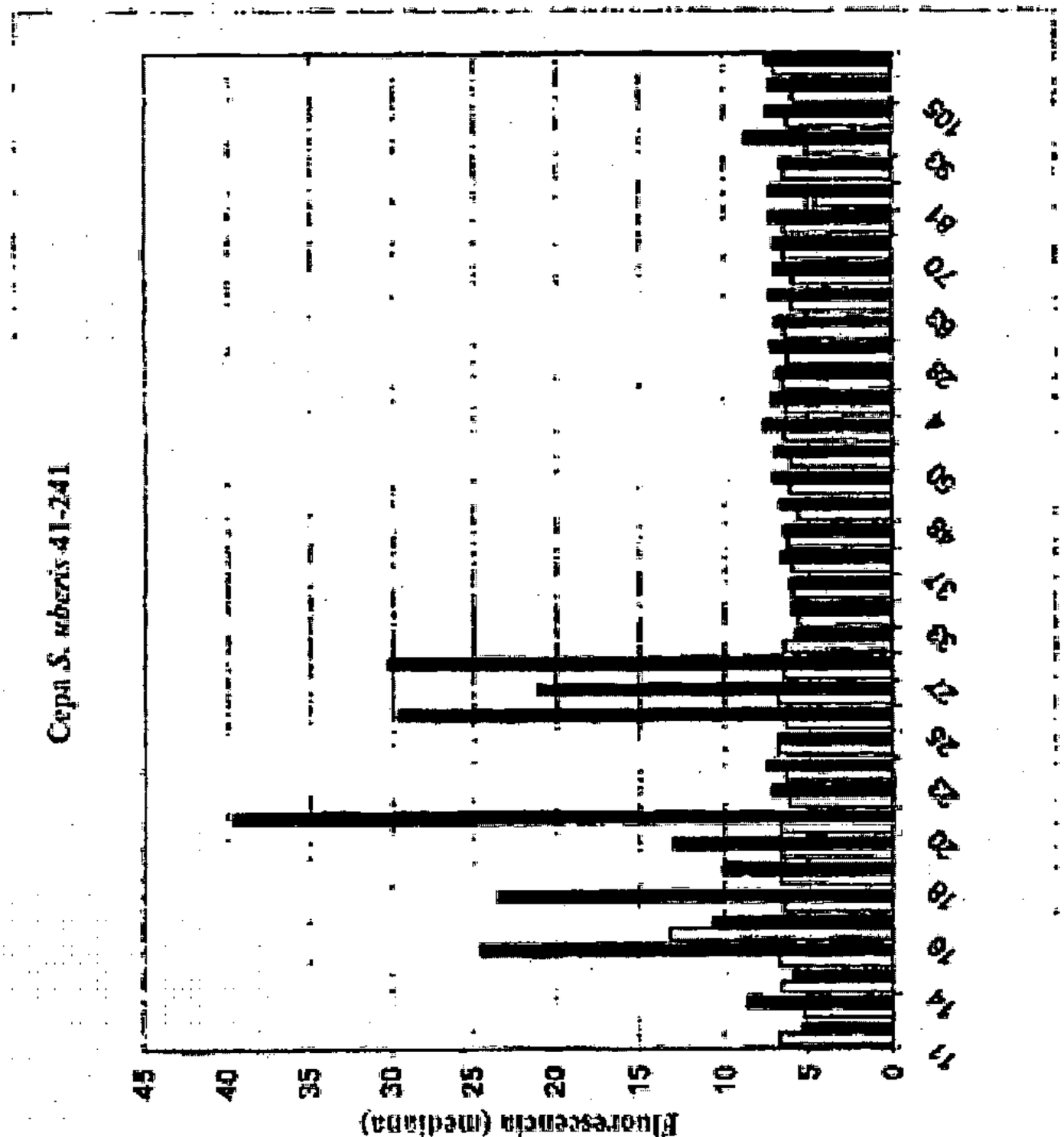


Fig. 1A

Análisis FACS en cepa *S. uberis* 41-241 intacta



326

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 12,229
FECHA : FEBRERO 15 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-025154- -00000-0000

Fecha: 2010-03-03 16:49:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 330

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175529583	15/02/2010	40,410,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	21 CERTIFICACIONES	13,000.00
		TOTAL : $	13,000.00

SON: TRECE MIL PESOS

RESPONSABLE _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

COLO:04484-841-018-7

327

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 12,318
FECHA : FEBRERO 15 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-025154- -00000-0000
Fecha: 2010-03-03 16:49:12 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 330

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175529583	15/02/2010	40,410,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	3 PROC. REGISTRO DE MARCAS Y LEMAS	706,000.00
		TOTAL : $	706,000.00

SON: SETECIENTOS SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

COLO: 04484-841-018-7

328

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 12,319
FECHA : FEBRERO 15 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-025154- -00000-0000
Fecha: 2010-03-03 16:49:12 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 330

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175529583	15/02/2010	40,410,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	3 PROC. REGISTRO DE MARCAS Y LEMAS	706,000.00
		TOTAL : $	706,000.00

SON: SETECIENTOS SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

COLO: 04484 - 841-018 -7

329

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 12,341
FECHA : FEBRERO 15 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-025154 - -00000-0000
Fecha: 2010-03-03 16:49:12 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE!YII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 330

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175529583	15/02/2010	40,410,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS		5,000.00
		TOTAL :	$	5,000.00

SON: CINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

COLO : 04484 - 841 - 018 - 7

330

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 14,431
FECHA : FEBRERO 22 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-025154- -00000-0000
Fecha: 2010-03-03 16:49:12 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 330

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	175552554	22/02/2010	57,025,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL : $	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

COLO: 04484-891-018-7.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-025154- -00000-0000
Fecha: 2010-03-03 16:49:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 330

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☑ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☑ Indicación que se solicita una PCT
- ☑ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☑ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☑ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☑ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Bogotá,
2020

Doctor(a)
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA
Apoderado(a) y/o Representante de
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GMBH

REFERENCIA	Radicación No.	10 25154
	Solicitud internacional	PCT/NL2008/050537
	Fecha inicio fase nacional	06/03/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	0 04810

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continua en la página siguiente...

Radicación No.:10 25154

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 09 ABR. 2010
adpall