



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

(21) PI 1011856-0 A2



(22) Data do Depósito: 23/03/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 03/11/2020

(54) Título: POLIPEPTÍDEOS E COMPOSIÇÕES DE IMUNIZAÇÃO CONTENDO POLIPEPTÍDEOS GRAM-POSITIVOS E MÉTODOS DE USO

(51) Int. Cl.: A61K 39/085; A61K 39/38; C07K 14/00.

(30) Prioridade Unionista: 23/03/2009 US 61/210,772.

(71) Depositante(es): EPITOPIX, LLC.

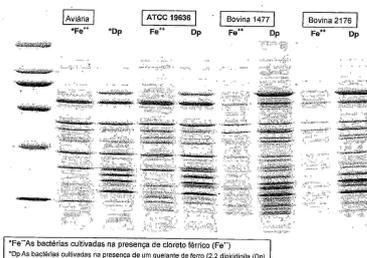
(72) Inventor(es): LISA L. HERRON-OLSON; DREW M. CATRON.

(86) Pedido PCT: PCT US2010028326 de 23/03/2010

(87) Publicação PCT: WO 2010/111273 de 30/09/2010

(85) Data da Fase Nacional: 21/09/2011

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE INFECÇÃO, DE SINTOMA OU DIMINUIÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS SPP., CONTENDO POLIPEPTÍDEOS GRAM-POSITIVOS, KIT PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS QUE SE LIGAM ESPECIFICAMENTE A TAIS POLIPEPTÍDEOS, BEM COMO USO DOS MESMOS. A presente invenção provê polipeptídeos isolados isoláveis de uma Staphylococcus spp. São também providas pela presente invenção composições que incluem um ou mais dos polipeptídeos e métodos para fabricação e métodos para uso dos polipeptídeos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE INFECÇÃO, DE SINTOMA OU DIMINUIÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS SPP., CONTENDO POLIPEPTÍDEOS GRAM-POSITIVOS, KIT PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS QUE SE LIGAM ESPECIFICAMENTE A TAIS POLIPEPTÍDEOS, BEM COMO USO DOS MESMOS".

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO RELACIONADO

O presente pedido reivindica prioridade do Pedido de Patente Provisório U.S. No. de Série 61/210.772 depositado em 23 de março de 2009.

10 ANTECEDENTES

Bactérias gram-positivas são um grupo notadamente diverso de organismos que causam uma variedade de doenças em ambos humanos e animais. Alguns dos patógenos reconhecidos como importantes em saúde humana e/ou animal incluem bactérias pertencentes às famílias *Corynebacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Micrococcaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae* e *Peptococcaceae*, que incluem espécies bacterianas tais como *Actinomyces* spp., *Bifidobacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Erysipelothrix* spp., *Eubacterium* spp., *Kytococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Micrococcus* spp., *Mobiluncus* spp., *Mycobacteria* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Propionibacterium* spp. e *Staphylococcus* spp. Esses patógenos causam uma grande variedade de manifestações clínicas em muitas espécies animais diferentes. O tratamento para tais infestações tem sido historicamente antibióticos que atacam as estruturas e funções comuns dos organismos gram-positivos. No entanto, muitos dos organismos gram-positivos ubíquos desenvolveram resistência a várias classes de antibióticos, tornando o tratamento de infecções difícil. O uso disseminado de antibióticos no tratamento de doenças bacterianas em ambos humanos e animais de produção de alimento é provavelmente um grande fator de contribuição na proliferação de linhagens resistentes a antibiótico de muitas espécies de organismos gram-positivos. Desta maneira, há uma grande necessidade em encontrar tratamentos diferentes que previnam ou eliminem infecções por organismos gram-positivos em animais bem como humanos.

Infecções *Staphylococcalis* em animais de agricultura

Na indústria agrícola várias doenças importantes são causa

das por organismos gram-positivos. Exemplos de condições clínicas causadas por infecções bacterianas gram-positivas incluem mastite, septicemia, pneumonia, osteomielite, meningoencefalite, linfangite, dermatite, infecções do trato genital, metrite, doença perinatal, abscessos da pituitária, artrite, bur-
5 site, orquite, cistite e pielonefrite, linfadenite caseosa, tuberculose, linfangite ulcerativa, erisipela, laminite, doença de tyzzer, tétano, botulismo, enterite, edema maligno, abraxia, hemoglobinúria baciliar, enterotoxemia. *Staphylococcus spp.*, em particular, são capazes de infectar muitas espécies diferentes de animais agrícolas e podem causar grandes perdas econômicas.
10 Por exemplo, a indústria de laticínio Norte-americana é estimada perder aproximadamente \$185 por vaca anualmente devido à mastite, uma doença frequentemente causada por *Staphylococcus aureus*. Uma vez que há 9,5 milhões de cabeças de vacas leiteiras nos Estados Unidos, o custo anual de mastite é aproximadamente \$1,8 bilhão. Isto é aproximadamente 10% do
15 valor total das vendas de leite das fazendas e cerca de dois-terços desta perda são devido à produção de leite reduzida em vacas subclínicamente infectadas. Outras perdas são devido a leite anormal descartado e leite retirado de vacas tratadas com antibiótico, custos de substituição precoce de vacas afetadas, valor de venda reduzido de vacas selecionadas, custos de
20 fármacos e serviços veterinários e custos de trabalho aumentados. Em adição à sua prevalência dentro da indústria de laticínio bovino, a mastite causada por *cocci* gram-positivo é também comum entre cabras e ovelha. Doenças animais adicionais causadas por *S. aureus* incluem botriomicose em cavalos, sinovite purulenta e osteomielite em aves, obstruções nasais em
25 coelhos, abortos em suíno e piemia por carrapato em cordeiros. Outras espécies de *staphylococci* são patógenos de pele principais de canino (*S. intermedius*) e suíno (*S. hycius*). Em espécies de aves, patógenos *staphylococcal* causam endocardite e septicemia.

Infecções *staphylococcal* em seres humanos

30 *Staphylococcus spp.* são também patógenos humanos que causam uma ampla variedade de infecções. A espécie *Staphylococcus aureus*, um colonizador comum de mucosa e pele humanas, é um patógeno oportu-

nístico que pode causar infecções humanas diversas. Por exemplo, *S. aureus* é o agente causador de várias infecções de pele, incluindo impetigo, furunculose, celulite e síndrome da pele escaldada, bem como infecções de ferida pós-cirúrgica potencialmente fatais. Ainda, a exposição de indivíduos imunocomprometidos à *S. aureus* em ambientes hospitalares resultou em infecções de órgão tais como pneumonia, infecções do trato urinário, osteomielite, artrite, bacteremia e endocardite. *S. aureus* é também o agente causador de toxinoses, mais notadamente síndrome do choque tóxico e envenenamento de comida. Envenenamento de comida causado pela enterotoxina *staphylococcal* B é a causa mais comum de doença de origem em comida, ultrapassando até mesmo a salmonelose, a campilobacteriose e a listeriose. Outras espécies de *staphylococci* também causam doença humana; *S. epidermis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* geralmente infectam dispositivos médicos implantados e *S. saprophyticus* está associada com infecções do trato urinário em mulheres.

Mecanismos de virulência de *staphylococci*

Staphylococci infectam uma variedade de tecidos hospedeiros e evadem o sistema imune através da produção de vários tipos de proteínas secretadas, fatores de virulência expressos na superfície e sistemas metabólicos planejados para sobrevivência no meio dos recursos limitados e defesas ativas associadas com o ambiente hospedeiro. Colonização é a primeira etapa necessária no estabelecimento de infecção; vários fatores incluindo cápsula, ácido lipoteicoico e ácido teicoico são componentes estruturais comuns que contribuem para a colonização. Ainda, proteínas de superfície tais como proteína de ligação à fibronectina *staphylococcal* e proteínas de ligação à sialoproteína óssea se ligam especificamente a componentes do tecido hospedeiro. Toxinas são geralmente produzidas dentre os patógenos *staphylococcais* e são altamente prejudiciais; várias doenças humanas, incluindo envenenamento de alimento, síndrome do choque tóxico e condições de pele esfoliativa, são o resultado direto de proteínas de toxina secretada extracelular. Um único isolato pode codificar genes para 20-30 toxinas secretadas diferentes. Alguns dos produtos de proteína secretada são superantí-

genos que se ligam não-especificamente à molécula de Classe II da MHC de uma célula apresentando antígeno e, simultaneamente, ao receptor de célula T de uma célula T. A ligação induz sinalização de célula T e leva à liberação de níveis altos de fatores pró-inflamatórios, por fim induzindo dano ao hospedeiro devido à resposta imune devastadora. Outra classe de fatores de virulência expressos na superfície oculta as bactérias do sistema imune hospedeiro. Por exemplo, a Proteína A expressa na superfície de *S. aureus* inibe a opsonização e a fagocitose através da ligação do componente Fc de anticorpo hospedeiro. Várias proteases, hemolisinas (alfa, beta, gama e delta), nucleases, lipases, hialuronidasas e colagenase também auxiliam as bactérias na extração de nutrientes de células circundantes e proteção delas contra defesas do hospedeiro.

Resistência a antibiótico dentre *staphylococci*

A CDC estima que a cada ano quase 2 milhões de pessoas nos Estados Unidos adquiram uma infecção nosocomial, resultando em 90.000 mortes anualmente. Dessas infecções fatais, 70% são causadas por bactérias resistentes a antibióticos. O aumento em resistência a antibiótico dentre as espécies microbianas é particularmente pronunciado em colonizadores de pele e mucosais tal como *S. aureus*. Por exemplo, a maioria de *S. aureus* isolada de ambientes hospitalares é resistente à penicilina e 50% são também resistentes às penicilinas semissintéticas, tais como metcilina, nafcilina e oxacilina. Esses isolados, referidos como MRSA (*S. aureus* resistente à meticina) (*methicillin resistant S. aureus*), foram primeiro vistos nos anos 70 e agora firmemente estabelecidos em ambientes hospitalares. Recentemente houve vários casos de infecções por MRSA na comunidade, onde os indivíduos infectados não tiveram nenhuma exposição prévia a hospitais e profissionais de cuidado de saúde. Esta tendência alarmante é intensificada pelo isolamento de isolatos de MRSA que são menos suscetíveis à vancomicina, um glicopeptídeo usado para tratar MRSA. Pouquíssimas linhagens foram mostradas ser verdadeiramente resistentes à vancomicina de acordo com a definição do CDC de resistência à vancomicina, mas várias linhagens de MRSA foram caracterizadas como consistindo em subpopulações com

susceptibilidade reduzida à vancomicina, ou VISA (*S. aureus* intermediária à vancomicina) (*Vancomycin Intermediate S. aureus*). Uma vez que o isolamento de linhagens resistentes à vancomicina e intermediárias à vancomicina é um desenvolvimento relativamente novo, há poucos dados com relação à sua prevalência em hospitais e/ou na comunidade. Ocasionalmente, VRSA (*S. aureus* resistente à vancomicina) (*Vancomycin Resistant S. aureus*) com resistência integral à vancomicina e carregando um plasmídeo de resistência provavelmente adquirido de *Enterococcus spp.* foi também recuperada de humanos.

10 Estratégias para prevenção e tratamento de infecções por *Staphylococcus*

A emergência de vários patógenos gram-positivos que são resistentes a antibióticos múltiplos tem alimentado os esforços de pesquisa com o objetivo de desenvolver vacinas preventivas para proteger contra doenças. As vacinas são projetadas para serem administradas a pacientes a fim de elicitar uma resposta de memória a longo prazo do sistema imune, de maneira que se o patógeno for encontrado no futuro, o sistema imune pode mais rapidamente e eficientemente eliminar o patógeno. Até agora, uma vacina amplamente protetora contra patógenos gram-positivos associados com várias doenças humanas, particularmente aquelas doenças associadas com infecções *staphylococais*, não está disponível. Abordagens de desenvolvimento de vacina para a prevenção de infecções *staphylococais* incluem aquelas relatando o uso de componentes de superfície microbiana reconhecendo moléculas de matriz de adesão [MSCRAMMS Nilsson e outros, 1998. *J. Clin. Invest.* 101:2640-9; Menzies e outros, 2002. *J. Infect. Dis.* 185:937-43; Fattom e outros, 2004. *Vaccine* 22:880-7], polissacarídeos de superfície (McKenney e outros, 2000; McKenney e outros, 1999. *Science* 284:1523-7; Maira-Litran e outros, 2002. *Infect Immun.* 70:4433-40; Maira-Litran e outros, 2004. *Vaccine* 22:872-9; Maira-Litran e outros, 2005. *Infect. Immun.* 73 : 6752-62) e exoproteínas mutadas (Lowell e outros, 1996. *Infect. Immun.* 64 :4686-93 ; Stiles e outros, 2001. *Infect. Immun.* 69:2031-6; Gampfer e outros, 2002. *Vaccine* 20:3675- 84), como antígenos em composições de vacina de subunidade, bem como uma linhagem avirulenta viva (Reinoso e outros,

2002. *Can. J. Vet. Res.* 66:285-8) e várias abordagens de vacina de DNA (Ohwada e outros, 1999. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:767-74); Brouillette e outros, 2002. *Vaccine* 20:2348-57; Senna e outros, 2003. *Vaccine* 21:2661-6). Embora muitas dessas composições tenham mostrado algum grau de
5 proteção, elas obtiveram pouca proteção cruzada contra linhagens *staphylococcalis* diversas e falharam ainda em elicitar respostas imunes substanciais em pacientes imunocomprometidos, uma população sob risco importante para infecções nosocomiais.

As doenças *staphylococcalis* mais severas são aquelas mediadas pelas exotoxinas pirogênicas superantigênicas (SPEs) (*Superantigenic pyrogenic exotoxins*) mencionadas acima que estimulam não-especificamente células T independentes de apresentação de antígeno. Tais doenças incluem síndrome do choque tóxico, doença de pele esfoliativa e possivelmente síndrome de Kawasaki. Para essas doenças mediadas por
10 SPE, agentes imunoterapêuticos que reforçam o sistema imune durante uma infecção ativa são frequentemente mais eficazes do que vacinas, que são tipicamente administradas antes da infecção. A natureza devastadora da resposta imune à SPE necessita de redução rápida em atividade de toxina como o primeiro objetivo em terapia. Até agora, neutralização de toxina em
15 doença mediada por *S. aureus* foi acompanhada com mais eficácia através da administração de imunoglobulina humana intravenosa (IVIG) (*Intravenous Immunoglobulin*), uma preparação de anticorpo humano concentrada, purificada, de milhares de doadores humanos (Takei e outros, 1993, *J. Clin. Invest.* 91:602-7; Stohl e Elliot, 1996. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 79:122-
20 33). A distribuição disseminada de *S. aureus*, que coloniza aproximadamente 30% de adultos humanos saudáveis, coincide com taxas de exposição altas para a maioria da população, então o nível de anticorpos antitoxina anti-*staphylococcal* em IVIG é frequentemente suficiente para neutralizar toxina o tempo suficiente para estabilizar a resposta imune até que a carga de bac-
25 téria seja reduzida com antibióticos (Schlievert, 2001. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108(4 Supl.):S107-110). Preparações de IVIG de fabricantes múltiplos foram mostradas neutralizar toxina em ensaios de proliferação com células
30

mononucleares de sangue periférico humano, inibir diferenciação de célula B direcionada por célula T humana induzida por toxina *in vitro* (Stohl e Elliot, 1996. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 79:122-33; Stohl e Elliott, 1995. *J. Immunol* 155:1838-50; Stohl e outros, 1994, *J. Immunol.* 153:117-27) e reduzir

5 secreção de IL-4 e IL-2 em PBMCs estimuladas com enterotoxina B *staphylococcal* (Takei e outros, 1993, *J. Clin. Invest.* 91:602-7; Darenberg e outros, 2004. *Clin. Infect. Dis.* 38:836-42). Terapia com IVIG, com sua habilidade comprovada em neutralizar SPE, é agora uma terapia recomendada para

10 tratamento para síndrome do choque tóxico *staphylococcal* (Schlievert, 2001. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108 (4 Supl.):S107-110). Uso de IVIG como uma lavagem imunoprotetora durante cirurgia foi também investigado em camundongos (Poelstra e outros, 2000. *Tissue Eng.* 6(4):401-411). Embora IVIG padrão tenha utilidade para limitação do avanço de alguma doença mediada

15 por SPE *staphylococcal*, a segurança, a eficácia e a consistência de preparações de IVIG humanas geradas a partir de milhares de doadores humanos não-selecionados permanecem controversas (Baker e outros, 1992. *N. Engl. J. Med.* 327:213-9; Miller e outros, 2001, *J. Allergy Clin. Immunol.* 108:S91-4, Sacher, 2001. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108:S139-46; Darenberg e outros,

20 2004. *Clin. Infect. Dis.* 38:836-42). Ainda, o benefício de IVIG na prevenção de infecções *staphylococcalis* é duvidável (Baker e outros, 1992. *N. Engl. J. Med.* 327:213-9; Hill, H.R. 2000. *J. Pediatr.* 137:595-7; Darenberg e outros, 2004. *Clin. Infect. Dis.* 38:836-42). A fim de aumentar a eficácia de IVIG no

tratamento de infecções *staphylococcalis* em certas populações sob risco,

25 uma IgG humana anti-*staphylococcal* policlonal, selecionada de doador, derivada de plasma, com títulos altos de anticorpo direcionado ao fator A de coagulação MSCRAMMS *staphylococcal* (ClfA) e proteína G de ligação a fibrinogênio (SdrG) foi criada e testada com sucesso em bebês com peso de

nascimento muito baixo para prevenir sepse *staphylococcal* (Vernachio e

30 outros, 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3400-6; Bloom e outros, 2005. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 24:858-866; Cappareli e outros, 2005. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4121-7). Um anticorpo monoclonal humanizado

específico com relação ao fator A de coagulação MSCRAMM de *S. aureus* está também sendo desenvolvido. O anticorpo foi selecionado de um grupo de milhares de anticorpos anti-ClfA de murino quanto à sua habilidade em se ligar a ClfA de uma maneira que anula ligação de *S. aureus* à fibronectina humana e foi subsequentemente humanizado através de mutação de resíduos direcionados específicos para imitar o anticorpo do subgrupo de linha germinativa humana homólogo (Hall e outros, 2003, *Infect. Immun.* 71:6864-70; Domanski e outros, 2005, *Infect. Immun.* 73:5229-32). O anticorpo específico está sendo projetado para uso em conjunto com antibióticos para o tratamento de várias infecções por *S. aureus* ameaçadoras à vida severas, embora estudos em animal também demonstrem um efeito protetor profilático.

SUMÁRIO

Em um aspecto, a presente invenção provê composições incluindo dois ou mais polipeptídeos isolados. Um polipeptídeo isolado na composição tem um peso molecular conforme determinado através de eletroforese em um gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa ou 33 kDa. Por exemplo, uma composição pode incluir proteínas isoladas de 88 kDa e 55 kDa. Em alguns aspectos a composição pode incluir polipeptídeos isolados tendo pesos moleculares de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa ou 33 kDa. Os polipeptídeos podem ser isoláveis de uma *Staphylococcus aureus* quando incubados em meios incluindo um quelante de ferro e não-isoláveis quando cultivados no meio sem o quelante de ferro. A composição protege um animal, tal como um camundongo ou vaca ou ser humano, contra provocação com uma linhagem de *S. aureus* tal como, por exemplo, a linhagem ATCC 19636. A composição pode incluir ainda um veículo farmacologicamente aceitável e pode incluir ainda um ou mais polipeptídeos isolados tendo um peso molecular de 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa ou 40 kDa e isolado de uma *S. aureus* quando cultivado no meio sem o quelante de ferro. Em alguns aspectos os polipeptídeos da composição podem ser isolados de *S. aureus* linhagem ATCC 19636.

Em algumas modalidades cada polipeptídeo da composição tem uma impressão digital de massa de pelo menos 80% de similaridade com uma impressão digital de massa de um polipeptídeo do polipeptídeo do mesmo peso molecular expresso por *Staphylococcus aureus* linhagem ATCC 19636, onde o polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro e não-isolável quando cultivado no meio sem o quelante de ferro. Por exemplo, o polipeptídeo isolado com um peso molecular de 88 kDa tem uma impressão digital de massa de pelo menos 80% de similaridade com uma impressão digital de massa de um polipeptídeo de 88 kDa expresso por *Staphylococcus aureus* linhagem ATCC 19636 e o polipeptídeo isolado com um peso molecular de 55 kDa tem uma impressão digital de massa de pelo menos 80% de similaridade com uma impressão digital de massa de um polipeptídeo de 55 kDa expresso por *Staphylococcus aureus* linhagem ATCC 19636.

Em outro aspecto, a presente invenção provê composições que incluem um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO:408 e SEQ ID NO:397. A composição pode incluir ainda pelo menos um segundo polipeptídeo, onde o segundo polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubada em meios compreendendo um quelante de ferro e não-isolável quando cultivada nos meios sem o quelante de ferro. Em alguns casos, o segundo polipeptídeo pode incluir uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com uma sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID NO:353, SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:375, SEQ ID NO:386 e SEQ ID NO:149. Em outros casos, o segundo polipeptídeo pode ter um peso molecular conforme determinado através de eletroforese em um gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa ou 33 kDa. A composição pode incluir ainda um ou mais polipeptídeos isolados isoláveis de uma *S. aureus* quando cultivado em meios sem o quelante de ferro e tem um peso molecular de 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa ou 40 kDa

A presente invenção também provê métodos para uso das composições. Em um aspecto, o método é para tratamento de infecção em um indivíduo e inclui administração de uma quantidade eficaz de uma composição da presente invenção a um indivíduo tendo ou sob risco de ter uma infecção causada por *Staphylococcus spp.* Em outro aspecto, o método é para tratamento de um sintoma em um indivíduo e inclui administração de uma quantidade eficaz de uma composição da presente invenção a um indivíduo tendo uma infecção causada por *Staphylococcus spp.* O indivíduo pode ser um mamífero tal como um ser humano, cavalo ou vaca. A *Staphylococcus spp.* pode ser *S. aureus*.

A presente invenção provê ainda métodos para uso de anticorpo, por exemplo, anticorpo policlonal, que se liga especificamente a polipeptídeos da presente invenção. Em um aspecto, o método é para tratamento de uma infecção em um indivíduo e inclui administração de uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo tendo ou sob risco de ter uma infecção causada por *Staphylococcus spp.*, onde a composição inclui anticorpo que se liga especificamente a pelo menos um e, em alguns casos, mais de um, polipeptídeo isolado da presente invenção. Em outro aspecto, o método é para tratamento de um sintoma em um indivíduo e inclui administração de uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo tendo uma infecção causada por *Staphylococcus spp.*, onde a composição inclui anticorpo que se liga especificamente a pelo menos um e, em alguns casos, mais de um, polipeptídeo isolado da presente invenção. O indivíduo pode ser um mamífero, tal como um ser humano, cavalo ou vaca. A *Staphylococcus spp.* pode ser *S. aureus*.

São também providos pela presente invenção métodos para diminuição da colonização em um indivíduo. Em um aspecto, o método inclui administração de uma quantidade eficaz de uma composição da presente invenção a um indivíduo colonizado por uma *Staphylococcus spp.* Em outro aspecto, o método inclui administração de uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo colonizado por *Staphylococcus spp.*, onde a composição inclui anticorpo que se liga especificamente a pelo menos um e,

em alguns casos, mais de um, polipeptídeo isolado da presente invenção.

A presente invenção provê um kit para detecção de anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo. O kit inclui, em recipientes separados, um polipeptídeo isolado da presente invenção e um reagente
5 que detecta um anticorpo que se liga especificamente ao polipeptídeo.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1. O perfil eletroforético das proteínas de linhagens diferentes de *Staphylococcus aureus* derivadas de espécies diferentes cultivadas com e sem ferro (faixas marcadas Fe⁺⁺ e DP, respectivamente).

10 Figura 2. A diferença em mortalidade entre camundongos vacinados e não-vacinados após provocações homóloga e heteróloga com *Staphylococcus aureus*.

Figura 3. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier mostram a sobrevivência percentual após vacinação e provocação homóloga com *S. aureus* ATCC 19636.
15

Figura 4. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier mostrando a sobrevivência percentual após vacinação e provocação heteróloga com *S. aureus* ATCC 19636.

Figura 5. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier mostrando sobrevivência percentual após imunização passiva e provocação homóloga com *S. aureus* ATCC 19636.
20

Figura 6. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier mostrando sobrevivência percentual após imunização passiva e provocação heteróloga com *S. aureus* linhagem 1477.

25 Figura 7. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC 19636. (SEQ ID NO:353).

Figura 8. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:354).

Figura 9. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:355).
30

Figura 10. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:356).

Figura 11. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:357).

Figura 12. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:358).

5 Figura 13. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:359).

Figura 14. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:360).

10 Figura 15. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:361).

Figura 16. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:362).

Figura 17. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:363).

15 Figura 18. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC19636. (SEQ ID NO:364).

Figura 19. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:365).

20 Figura 20. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:366).

Figura 21. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:367).

Figura 22. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:368).

25 Figura 23. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:369).

Figura 24. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:370).

30 Figura 25. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:371).

Figura 26. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:372).

Figura 27. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:373).

Figura 28. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:374).

5 Figura 29. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC19636. (SEQ ID NO:375).

Figura 30. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:376).

10 Figura 31. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:377).

Figura 32. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:378).

Figura 33. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:379).

15 Figura 34. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:380).

Figura 35. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:381).

20 Figura 36. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:382).

Figura 37. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:383).

Figura 38. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:384).

25 Figura 39. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:385).

Figura 40. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC19636. (SEQ ID NO:386).

30 Figura 41. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:387).

Figura 42. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:388).

Figura 43. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:389).

Figura 44. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:390).

5 Figura 45. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:391).

Figura 46. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:392).

10 Figura 47. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:393).

Figura 48. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:394).

Figura 49. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:395).

15 Figura 50. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:396).

Figura 51. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC19636. (SEQ ID NO:397).

20 Figura 52. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:398).

Figura 53. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:399).

Figura 54. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:400).

25 Figura 55. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:401).

Figura 56. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:402).

30 Figura 57. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:403).

Figura 58. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:404).

Figura 59. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:405).

Figura 60. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:406).

5 Figura 61. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:407).

Figura 62. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC19636. (SEQ ID NO:408).

10 Figura 63. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:409).

Figura 64. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:410).

Figura 65. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:411).

15 Figura 66. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:412).

Figura 67. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:413).

20 Figura 68. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:414).

Figura 69. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:415).

Figura 70. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:416).

25 Figura 71. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:417).

Figura 72. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:418).

30 Figura 73. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC19636. (SEQ ID NO:419).

Figura 74. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:420).

Figura 75. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:421).

Figura 76. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:422).

5 Figura 77. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:423).

Figura 78. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:424).

10 Figura 79. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:425).

Figura 80. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:426).

Figura 81. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:427).

15 Figura 82. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:428).

Figura 83. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:429).

20 Figura 84. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC 19636. (SEQ ID NO:430).

Figura 85. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:431).

25 Figura 86. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:432).

30 Figura 87. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:433).

Figura 88. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID

NO:434).

Figura 89. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:435).

5 Figura 90. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:436).

Figura 91. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:437).

10 Figura 92. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:438).

Figura 93. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:439).

15 Figura 94. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:440).

20 Figura 95. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC19636. (SEQ ID NO:441).

Figura 96. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:442).

25 Figura 97. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:443).

Figura 98. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:444).

30 Figura 99. Uma sequência de ácido nucleico codificando um po-

lipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:445).

Figura 100. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:446).

Figura 101. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:447).

Figura 102. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:448).

Figura 103. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:449).

Figura 104. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:450).

Figura 105. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:451).

Figura 106. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC19636. (SEQ ID NO:452).

Figura 107. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:453).

Figura 108. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:454).

Figura 109. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:455).

Figura 110. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:456).

5 Figura 111. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:457).

Figura 112. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:458).

10 Figura 113. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:459).

Figura 114. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:460).

15 Figura 115. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:461).

20 Figura 116. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:462).

Figura 117. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC19636. (SEQ ID NO:463).

25 Figura 118. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:464).

Figura 119. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:465).

30 Figura 120. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ

ID NO:466).

Figura 121. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:467).

5 Figura 122. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:468).

Figura 123. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID
10 NO:469).

Figura 124. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:470).

Figura 125. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID
15 NO:471).

Figura 126. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:472).

20 Figura 127. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:473).

Figura 128. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC19636.
25 (SEQ ID NO:474).

Figura 129. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:475).

Figura 130. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID
30 NO:476).

Figura 131. Uma sequência de ácido nucleico codificando um

polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:477).

Figura 132. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:478).

Figura 133. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:479).

Figura 134. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:480).

Figura 135. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:481).

Figura 136. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:482).

Figura 137. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:483).

Figura 138. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:484).

Figura 139. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC19636. (SEQ ID NO:485).

Figura 140. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:486).

Figura 141. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:487).

Figura 142. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:488).

5 Figura 143. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:489).

Figura 144. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:490).

10 Figura 145. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:491).

Figura 146. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:492).

15 Figura 147. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:493).

20 Figura 148. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:494).

Figura 149. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:495).

25 Figura 150. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* ATCC19636. (SEQ ID NO:496).

Figura 151. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:497).

30 Figura 152. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID

NO:498).

Figura 153. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:499).

5 Figura 154. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:500).

Figura 155. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:501).

10 Figura 156. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:502).

Figura 157. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:503).

15 Figura 158. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:504).

20 Figura 159. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:505).

Figura 160. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:506).

25 Figura 161. Curvas de sobrevivência Kaplan-Meier mostrando sobrevivência percentual após imunização passiva e provocação homóloga com *S. aureus* ATCC 25904. A, provocação intravenosa após vacinação com rMntC; B, provocação intraperitoneal após vacinação 2x com extrato de SIRP, vacinação 2x com rSIRP7 ou vacinação 3x com rSIRP7; C, provocação intravenosa após vacinação com rSIRP7.

Figura 162. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo re-

gulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:543).

Figura 163. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:544).

Figura 164. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:545).

Figura 165. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:546).

Figura 166. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:547).

Figura 167. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:548).

Figura 168. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:549).

Figura 169. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:550).

Figura 170. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:551).

Figura 171. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:552).

Figura 172. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:553).

Figura 173. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:554).

Figura 174. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:555).

Figura 175. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:556).

Figura 176. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:557).

Figura 177. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:558).

Figura 178. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo re-

gulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:559).

Figura 179. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:560).

Figura 180. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:561).

Figura 181. A sequência de aminoácido de um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:562).

Figura 182. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:563).

Figura 183. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:564).

Figura 184. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:565).

Figura 185. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:566).

Figura 186. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:567).

Figura 187. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:568).

Figura 188. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:569).

Figura 189. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:570).

Figura 190. Uma sequência de ácido nucleico codificando um

polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:571).

Figura 191. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:572).

Figura 192. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* RF122. (SEQ ID NO:573).

Figura 193. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Mu50. (SEQ ID NO:574).

Figura 194. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MRSA252. (SEQ ID NO:575).

Figura 195. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MW2. (SEQ ID NO:576).

Figura 196. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* Newman. (SEQ ID NO:577).

Figura 197. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* JH9. (SEQ ID NO:578).

Figura 198. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* USA300. (SEQ ID NO:579).

Figura 199. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* COL. (SEQ ID NO:580).

Figura 200. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* NCTC8325. (SEQ ID NO:581).

Figura 201. Uma sequência de ácido nucleico codificando um polipeptídeo regulado por metal obtido a partir de *S. aureus* MSSA476. (SEQ ID NO:582).

5 Figura 202. *Western blot* mostrando ligação de soros convalescentes de camundongo a polipeptídeos regulados por metal produzidos recombinantemente.

Figura 203. Um *Western blot* mostrando ligação de soros de humanos saudáveis a polipeptídeos regulados por metal recombinantemente produzidos.

10 Figura 204. Um *Western blot* mostrando ligação de soros de humanos convalescentes a polipeptídeos regulados por metal produzidos recombinantemente.

Figura 205. Dados de citometria de fluxo mostrando expressão na superfície de *S. aureus* DU5875 de polipeptídeos regulados por metal.

15 Figura 206. Indução de citocina seguindo vacinação com rSIRP7 e reestimulação ou com extrato de SIRP ou rSIRP7.

DESCRIÇÃO DETALHADA DE MODALIDADES PREFERIDAS DA INVENÇÃO

20 A presente invenção provê polipeptídeos e composições incluindo polipeptídeos. Conforme aqui usado, "polipeptídeo" refere-se a um polímero de aminoácidos ligado por ligações de peptídeo. Desta maneira, por exemplo, os termos peptídeo, oligopeptídeo, proteína e enzima são incluídos na definição de polipeptídeo. Este termo também inclui modificações pós-expressão do polipeptídeo, tais como glicosilações, acetilações, fosforilações

25 e similar. O termo polipeptídeo não conota um comprimento específico de um polímero de aminoácido. Um polipeptídeo pode ser isolável diretamente de uma fonte natural ou pode ser preparado com o auxílio de técnicas recombinantes, enzimáticas ou químicas. No caso de um polipeptídeo que é de ocorrência natural, tal polipeptídeo é tipicamente isolado.

30 Um polipeptídeo "isolado" é um que foi removido de seu ambiente natural. Por exemplo, um polipeptídeo isolado é um polipeptídeo que foi removido do citoplasma ou da membrana de uma célula, e muitos dos poli-

peptídeos, ácidos nucleicos e outro material celular de seu ambiente natural não estão mais presentes.

Um polipeptídeo caracterizado como "isolável" de uma fonte particular é um polipeptídeo que, sob condições apropriadas, é produzido a partir da fonte identificada, embora o polipeptídeo possa ser obtido de fontes alternativas usando, por exemplo, técnicas recombinantes, químicas ou enzimáticas bem conhecidas daqueles de habilidade comum na técnica. Desta maneira, caracterização de um polipeptídeo como "isolável" a partir de uma fonte particular não implica qualquer fonte específica a partir da qual o polipeptídeo deve ser obtido ou quaisquer condições ou processos particulares sob os quais o polipeptídeo deve ser obtido.

Um polipeptídeo "purificado" é um que é pelo menos 60% livre, preferivelmente pelo menos 75% livre, e mais preferivelmente pelo menos 90% livre, de outros componentes com os quais eles estão naturalmente associados. Os polipeptídeos que são produzidos fora do organismo onde eles ocorrem naturalmente, por exemplo, através de meios químicos ou recombinantes, são considerados ser isolados e purificados por definição, uma vez que eles nunca se apresentam em um ambiente natural.

Conforme aqui usado, um "fragmento de polipeptídeo" refere-se a uma porção de um polipeptídeo que resulta da digestão de um polipeptídeo com uma protease.

A menos que de outra maneira especificado, "um", "uma", "o, a" e "pelo menos um, uma" são usados intercomutavelmente e significam um ou mais de um. O termo "compreende" e suas variações não têm um significado limitante onde esses termos aparecem no relatório e reivindicações.

Um polipeptídeo da presente invenção pode ser caracterizado por peso molecular, impressão digital de massa, sequência de aminoácido, ácido nucleico que codifica o polipeptídeo, atividade imunológica ou combinações de duas ou mais de tais características. O peso molecular de um polipeptídeo, tipicamente expresso em kilodáltons (kDa), pode ser determinado usando métodos de rotina incluindo, por exemplo, filtragem em gel, eletroforese em gel incluindo eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE)

com dodecil sulfato de sódio (SDS), eletroforese capilar, espectrometria de massa, cromatografia líquida (incluindo HPLC) e cálculo do peso molecular de uma sequência de aminoácido observada ou prevista. A menos que de outro modo indicado, peso molecular refere-se a peso molecular conforme determinado através da separação de um polipeptídeo usando um gel de poliacrilamida SDS tendo um gel de empilhamento de cerca de 4% e um gel de separação de cerca de 10% sob condições de redução e desnaturação.

Conforme aqui usado, uma "impressão digital de massa" refere-se a uma população de fragmentos de polipeptídeo obtidos de um polipeptídeo após digestão com uma protease. Tipicamente, os fragmentos de polipeptídeo resultantes de uma digestão são analisados usando um método espectrométrico de massa. Cada fragmento de polipeptídeo é caracterizado por uma massa, ou por uma razão de massa (m) para carga (z), que é referida como uma "razão m/z " ou um "valor m/z ". Métodos para geração de uma impressão digital de massa de um polipeptídeo são rotina. Um exemplo de tal método é revelado no Exemplo 13.

Um polipeptídeo da presente invenção pode ser um polipeptídeo regulado por metal. Conforme aqui usado, um "polipeptídeo regulado por metal" é um polipeptídeo que é expresso por um micróbio em um nível maior do que quando o micróbio é cultivado em condições com pouco metal comparado com o cultivo do mesmo micróbio em condições com alto teor de metal. Condições de baixo teor de metal e alto teor de metal são descritas aqui. Por exemplo, uma classe de polipeptídeo regulado por metal produzido por *Staphylococcus spp.* não é expressa em níveis detectáveis durante o cultivo do micróbio em condições com alto teor de metal, mas é expressa em níveis detectáveis durante o cultivo em condições com baixo teor de metal.

Exemplos de polipeptídeos regulados por metal isoláveis de *S. aureus* após cultivo em condições com baixo teor de ferro têm pesos moleculares de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa e 33 kDa. Exemplos de polipeptídeos regulados por metal isoláveis de *S. aureus* após cultivo em condições com baixo teor de cobre ou baixo teor de zinco têm pesos moleculares de 115 kDa, 88 kDa, 80 kDa, 71 kDa, 69 kDa, 35 kDa, 30

kDa, 29 kDa e 27 kDa.

Exemplos adicionais de polipeptídeos regulados por metal incluem versões recombinantemente produzidas de polipeptídeos descritos aqui. Um polipeptídeo recombinantemente produzido pode incluir a sequência de aminoácido inteira traduzível a partir de um transcrito de mRNA. Alternativamente, um polipeptídeo regulado por metal produzido recombinantemente pode incluir um fragmento ou porção de toda a sequência de aminoácido traduzível. Por exemplo, um polipeptídeo regulado por metal produzido recombinantemente pode não ter uma sequência clivável em nenhum terminal do polipeptídeo, por exemplo, uma sequência de sinal clivável no terminal amino do polipeptídeo.

Desta maneira, um polipeptídeo regulado por metal pode ser um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada nas, por exemplo, SEQ ID NO:353, SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:375, SEQ ID NO:386, SEQ ID NO:397, SEQ ID NO:408 e SEQ ID NO:419.

A presente invenção também inclui polipeptídeos que não são regulados por metal. Tais polipeptídeos são expressos na presença de um íon de metal tal como, por exemplo, na presença de cloreto férrico, e também expressos quando cultivados em condições com baixo teor de ferro. Exemplos de tais polipeptídeos isoláveis de *S. aureus* têm pesos moleculares de 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa e 40 kDa.

Se um polipeptídeo é um polipeptídeo regulado por metal ou não pode ser determinado através de métodos úteis para comparação da presença de polipeptídeos, incluindo, por exemplo, filtração em gel, eletroforese em gel incluindo eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (PAGE-SDS), eletroforese capilar, espectrometria de massa e cromatografia líquida incluindo HPLC. Culturas separadas de um micróbio são cultivadas sob condições de alto teor de metal e sob condições de baixo teor de metal, os polipeptídeos da presente invenção são isolados conforme descrito aqui e os polipeptídeos presentes em cada cultura são separados e comparados. Tipicamente, uma quantidade igual de polipeptídeos de cada

cultura é usada. Preferivelmente, os polipeptídeos são separados usando um gel de poliacrilamida SDS tendo um gel de empilhamento de cerca de 4% e um gel de separação de cerca de 10% sob condições de redução e desnaturação. Por exemplo, 30 microgramas (μg) de polipeptídeo total de cada cultura podem ser usados e carregados em cavidades de um gel. Após 5 ativação do gel e tingimento dos polipeptídeos com Coomassie Brilliant Blue, as duas faixas podem ser comparadas. Quando determinando se um polipeptídeo é ou não expresso em um nível detectável, 30 μg de polipeptídeo total de uma cultura são separados em um Gel de PAGE-SDS e tingido com 10 Coomassie Brilliant Blue usando métodos conhecidos na técnica. Um polipeptídeo que pode ser visualizado pelo olho é considerado ser expresso em um nível detectável, enquanto um polipeptídeo que não pode ser visualizado pelo olho é considerado não ser expresso em um nível detectável.

Alternativamente, se um polipeptídeo é regulado por metal ou 15 não pode ser determinado usando análise de expressão de gene baseada em microdisposição. Culturas separadas de um micróbio são cultivadas sob condições de alto teor de metal e sob condições de baixo teor de metal, RNA é extraído das células de cada cultura e diferenças em expressão de RNA em células cultivadas em condições de alto teor de metal versus expressão 20 de RNA em células cultivadas em condições de baixo teor de metal são detectadas e comparadas. Por exemplo, cDNA marcado pode ser preparado a partir de 8-10 μg de RNA bacteriano usando protocolos estabelecidos. O cDNA marcado pode ser aplicado a uma microdisposição do genoma de *S. aureus*. Tais microdisposições estão comercialmente disponíveis e expressão 25 de gene usando tais disposições é rotina.

Os polipeptídeos da presente invenção podem ter atividade imunológica. "Atividade imunológica" refere-se à habilidade de um polipeptídeo em eliciar uma resposta imunológica em um animal. Uma resposta imunológica para um polipeptídeo é o desenvolvimento em um animal de uma resposta imune mediada por célula e/ou anticorpo para o polipeptídeo. Geralmente, uma resposta imunológica inclui, mas não está limitada a, um ou 30 mais dos efeitos que seguem: a produção de anticorpos, células B, células T

auxiliares, células T supressoras e /ou células T citotóxicas direcionadas a um epítopo ou epítopos do polipeptídeo. "Epítopo" refere-se ao sítio em um antígeno ao qual células B e/ou células T específicas respondem de maneira que anticorpo é produzido. A atividade imunológica pode ser protetora. "Atividade imunológica protetora" refere-se à habilidade de um polipeptídeo em eliciar uma resposta imunológica em um animal que previne ou inibe infecção por *Staphylococcus spp.*, por exemplo, *S. aureus*. Se um polipeptídeo tem atividade imunológica protetora pode ser determinado através de métodos conhecidos na técnica tais como, por exemplo, métodos descritos no Exemplo 5, 9 ou 12. Por exemplo, um polipeptídeo da presente invenção, ou combinação de polipeptídeos da presente invenção, protege um roedor tal como um camundongo contra provocação com *Staphylococcus spp.* Um polipeptídeo da presente invenção pode ter atividade soroativa. "Atividade soroativa" refere-se à habilidade de um polipeptídeo candidato em reagir com anticorpo presente em soro convalescente de um animal infectado com um *Staphylococcus spp.*, por exemplo, *S. aureus*. Em alguns aspectos, o soro convalescente pode ser de um animal infectado com o isolato ATCC 19636, linhagem SAAV1, linhagem 2176 ou linhagem 1477. Os polipeptídeos da presente invenção podem ter atividade imunorreguladora. "Atividade imunorreguladora" refere-se à habilidade de um polipeptídeo em agir de uma maneira não-específica para aumentar uma resposta imune a um antígeno particular. Métodos para determinação de se um polipeptídeo tem atividade imunorreguladora são conhecidos na técnica.

Um polipeptídeo da presente invenção pode ter as características de um polipeptídeo expresso por um micróbio de referência, isto é, um polipeptídeo de referência. As características podem incluir, por exemplo, peso molecular, impressão digital da massa, sequência de aminoácido ou qualquer combinação dos mesmos. O micróbio de referência pode ser um gram-positivo, preferivelmente um membro da família *Micrococcaceae*, preferivelmente *Staphylococcus spp.*, mais preferivelmente *Staphylococcus aureus*. Exemplos preferidos de linhagens são detalhados na Tabela 1.

Tabela 1. Linhagens bacterianas

<u>Célula bacteriana</u>	<u>Designação de laboratório</u>
<i>S. aureus</i>	isolato ATCC 19636
<i>S. aureus</i>	linhagem SAAV1
<i>S. aureus</i>	linhagem 1477
<i>S. aureus</i>	linhagem 2176

Quando o micróbio de referência é *S. aureus* isolato ATCC 19636, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver um peso molecular de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa ou 33 kDa e tiver uma impressão digital de massa que seja similar à impressão digital de massa de um polipeptídeo regulado por metal expresso por um micróbio de referência e tendo um peso molecular de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa ou 33 kDa, respectivamente. Preferivelmente, tais polipeptídeos são regulados por metal. Por exemplo, um polipeptídeo candidato pode ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver um peso molecular de 88 kDa e tiver uma impressão digital de massa similar à impressão digital de massa de um polipeptídeo regulado por metal de 88 kDa produzido pela linhagem de referência *S. aureus* isolato ATCC 19636.

Alternativamente, quando o micróbio de referência é *S. aureus* isolato ATCC 19636, um polipeptídeo candidato pode ser considerado um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver uma sequência de aminoácido que seja estruturalmente similar, conforme descrito em detalhes abaixo, à sequência de aminoácido da SEQ ID NO:353, SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:375, SEQ ID NO:386, SEQ ID NO:397, SEQ ID NO:408 ou SEQ ID NO:419.

Alternativamente, quando o micróbio de referência é *S. aureus* RF 122, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver uma sequência de aminoácido que é estruturalmente similar, conforme descrito em detalhes abaixo, à sequência de aminoácido da SEQ ID NO:354, SEQ ID NO:365, SEQ ID NO:376, SEQ ID NO:387, SEQ ID NO:398, SEQ ID NO:409 ou SEQ ID NO:420.

Alternativamente, quando o micróblio de referência é *S. aureus* Mu50, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver uma sequência de aminoácido que é estruturalmente similar, conforme descrito em detalhes abaixo, à sequência de aminoácido da SEQ ID NO:355, SEQ ID NO:366, SEQ ID NO:377, SEQ ID NO:388, SEQ ID NO:399, SEQ ID NO:410 ou SEQ ID NO:421.

Alternativamente, quando o micróblio de referência é *S. aureus* MRSA252, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver uma sequência de aminoácido que é estruturalmente similar, conforme descrito em detalhes abaixo, à sequência de aminoácido da SEQ ID NO:356, SEQ ID NO:367, SEQ ID NO:378, SEQ ID NO:389, SEQ ID NO:400, SEQ ID NO:411 ou SEQ ID NO:422.

Alternativamente, quando o micróblio de referência é *S. aureus* MW2, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver uma sequência de aminoácido que é estruturalmente similar, conforme descrito em detalhes abaixo, à sequência de aminoácido da SEQ ID NO:357, SEQ ID NO:368, SEQ ID NO:379, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:401, SEQ ID NO:412 ou SEQ ID NO:423.

Alternativamente, quando o micróblio de referência é *S. aureus* Newman, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver uma sequência de aminoácido que é estruturalmente similar, conforme descrito em detalhes abaixo, à sequência de aminoácido da SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:369, SEQ ID NO:380, SEQ ID NO:391, SEQ ID NO:402, SEQ ID NO:413 ou SEQ ID NO:424.

Alternativamente, quando o micróblio de referência é *S. aureus* JH9, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver uma sequência de aminoácido que é estruturalmente similar, conforme descrito em detalhes abaixo, à sequência de aminoácido da SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:370, SEQ ID NO:381, SEQ ID NO:392, SEQ ID NO:403, SEQ BD NO:414 ou SEQ ID NO:425.

Alternativamente, quando o micróblio de referência é *S. aureus* US A300, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptí-

deo da presente invenção se ele tiver uma sequência de aminoácido que é estruturalmente similar, conforme descrito em detalhes abaixo, à sequência de aminoácido da SEQ ID NO:360, SEQ ID NO:371, SEQ ID NO:382, SEQ ID NO:393, SEQ ID NO:404, SEQ ID NO:415 ou SEQ ID NO:426.

5 Alternativamente, quando o micróbio de referência é *S. aureus* COL, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver uma sequência de aminoácido que é estruturalmente similar, conforme descrito em detalhes abaixo, à sequência de aminoácido da SEQ ID NO:361, SEQ ID NO:372, SEQ ID NO:383, SEQ ID
10 NO:394, SEQ ID NO:405, SEQ ID NO:416 ou SEQ ID NO:427.

Alternativamente, quando o micróbio de referência é *S. aureus* NCTC 8325, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver uma sequência de aminoácido que é estruturalmente similar, conforme descrito em detalhes abaixo, à sequência de aminoácido da SEQ ID NO:362, SEQ ID NO:373, SEQ ID
15 NO:384, SEQ ID NO:395, SEQ ID NO:406, SEQ ID NO:417 ou SEQ ID NO:428.

Alternativamente, quando o micróbio de referência é *S. aureus* MSSA476, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver uma sequência de aminoácido que é estruturalmente similar, conforme descrito em detalhes abaixo, à sequência de aminoácido da SEQ ID NO:363, SEQ ID NO:374, SEQ ID NO:385, SEQ
20 ID NO:396, SEQ ID NO:407, SEQ ID NO:418 ou SEQ ID NO:429.

Quando o micróbio de referência é isolato de *S. aureus* SAAV1,
25 um polipeptídeo candidato pode ser considerado um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver um peso molecular de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa ou 33 kDa, e tem uma impressão digital de massa que é similar à impressão digital de massa de um polipeptídeo expresso por um micróbio de referência e tendo peso molecular de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa,
30 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa ou 33 kDa, respectivamente. Preferivelmente, tais polipeptídeos são regulados por metal. Por exemplo, um polipeptídeo candidato pode ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver um peso

molecular de 88 kDa e tiver uma impressão digital de massa similar à impressão digital de massa de um polipeptídeo regulado por metal de 99 kDa produzido pela linhagem de referência *S. aureus* isolato SAAV1.

Quando o micróbio de referência é *S. aureus* linhagem 2176, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver um peso molecular de 88 kDa, 80 kDa, 65 kDa, 55 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa, 33 kDa ou 32 kDa e tiver uma impressão digital de massa que é similar à impressão digital de massa de um polipeptídeo expresso por um micróbio de referência e tendo um peso molecular de 88 kDa, 80 kDa, 65 kDa, 55 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa, 33 kDa ou 32 kDa, respectivamente. Preferivelmente, tais polipeptídeos são regulados por metal. Por exemplo, um polipeptídeo candidato pode ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver um peso molecular de 88 kDa e tiver uma impressão digital de massa similar à impressão digital de massa de um polipeptídeo regulado por metal de 88 kDa produzido pela linhagem de referência *S. aureus* isolato 2176.

Quando o micróbio de referência é *S. aureus* linhagem 1477, um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver um peso molecular de 88 kDa, 80 kDa, 65 kDa, 55 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa, 33 kDa ou 32 kDa e tiver uma impressão digital de massa que é similar à impressão digital de massa de um polipeptídeo expresso por um micróbio de referência e tendo um peso molecular de 88 kDa, 80 kDa, 65 kDa, 55 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa, 33 kDa ou 32 kDa, respectivamente. Preferivelmente, tais polipeptídeos são regulados por metal. Por exemplo, um polipeptídeo candidato pode ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver um peso molecular de 88 kDa e tiver uma impressão digital de massa similar à impressão digital de massa de um polipeptídeo regulado por metal de 88 kDa produzido pela linhagem de referência *S. aureus* isolato 1477.

Conforme aqui usado, um polipeptídeo pode ser "estruturalmente similar" a um polipeptídeo de referência se a sequência de aminoácido do polipeptídeo possuir uma quantidade especificada de similaridade de se-

quência e/ou identidade de sequência comparado com o polipeptídeo de referência. Um polipeptídeo pode ser também "estruturalmente similar" a um polipeptídeo de referência se o polipeptídeo exibir uma impressão digital de massa possuindo uma quantidade especificada de identidade comparado com uma impressão digital de massa comparável do polipeptídeo de referência. Desta maneira, um polipeptídeo pode ser "estruturalmente similar" a um polipeptídeo de referência se, comparado com o polipeptídeo de referência, ele possuir um nível suficiente de identidade de sequência de aminoácido, similaridade de sequência de aminoácido, similaridade de impressão digital de massa ou combinação dos mesmos.

Similaridade de sequência de polipeptídeo e identidade de sequência de polipeptídeo

Similaridade estrutural de dois polipeptídeos pode ser determinada através do alinhamento dos resíduos dos dois polipeptídeos (por exemplo, um polipeptídeo candidato e qualquer polipeptídeo de referência apropriado descrito aqui) para otimizar o número de aminoácidos idênticos ao longo dos comprimentos de suas sequências; lacunas em uma ou ambas as sequências são permitidas na formação do alinhamento a fim de otimizar o número de aminoácidos idênticos, embora os aminoácidos em cada sequência não devam permanecer em sua ordem apropriada. Um polipeptídeo de referência pode ser um polipeptídeo descrito aqui ou qualquer polipeptídeo regulado por metal conhecido, conforme apropriado. Um polipeptídeo candidato é o polipeptídeo sendo comparado com o polipeptídeo de referência. Um polipeptídeo candidato pode ser isolado, por exemplo, de um micróbio, ou pode ser produzido usando técnicas recombinantes ou quimicamente ou enzimaticamente sintetizado.

A menos que modificado como de outra maneira descrito aqui, uma análise de comparação em par de sequências de aminoácido pode ser realizada usando o algoritmo BESTFIT no pacote GCG (versão 10.2, Madison WI). Alternativamente, os polipeptídeos podem ser comparados usando o programa Blastp do algoritmo de pesquisa BLAST 2, conforme descrito por Tatiana e outros (*FEMS Microbiol Lett.*, 174, 247-250 (1999)), e disponível

no website do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Os valores de *default* para todos os parâmetros de pesquisa BLAST 2 podem ser usados, incluindo matriz = BLOSUM62; penalidade de lacuna aberta = 11, penalidade de lacuna de extensão = 1, lacuna $\times_{dropoff}$ = 50, esperado = 5
10 10, tamanho da palavra = 3 e filtragem.

Na comparação de duas sequências de aminoácido, similaridade estrutural pode ser referida como "identidade percentual" ou pode ser referida como "similaridade" percentual. "Identidade" refere-se à presença de aminoácidos idênticos. "Similaridade" refere-se à presença de não apenas aminoácidos idênticos, mas também a presença de substituições conservativas. Uma substituição conservativa para um aminoácido em um polipeptídeo da invenção pode ser selecionada de outros membros da classe à qual o aminoácido pertence. Por exemplo, é bem conhecido na técnica de bioquímica de proteína que um aminoácido pertencente a um agrupamento de aminoácidos tendo um tamanho ou característica particular (tal como carga, hidrofobicidade e hidrofiliçidade) pode ser substituído por outro aminoácido sem alterar a atividade de uma proteína, particularmente em regiões da proteína que não estão diretamente associadas com atividade biológica. Por exemplo, aminoácidos não-polares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e tirosina. Aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina e glutamina. Os aminoácidos positivamente carregados (básicos) incluem arginina, lisina e histidina. Os aminoácidos negativamente carregados (ácidos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. Substituições conservativas incluem, por exemplo, Arg por Lys e vice versa para manter uma carga positiva; Asp por Glu e vice versa para manter uma carga negativa; Thr por Ser de maneira que um $-OH$ livre seja mantido; e Asn por Gln para manter um NH_2 livre. Da mesma maneira, análogos biologicamente ativos de um polipeptídeo contendo deleções ou adições de um ou mais aminoácidos contíguos ou não-contíguos que não eliminam uma atividade funcional – tal como, por exemplo, atividade imunológica – do polipeptídeo são também compreendidos.

Desta maneira, conforme aqui usado, referência a um polipeptídeo da presente invenção e/ou referência à sequência de aminoácido de uma ou mais SEQ ID NOs. pode incluir um polipeptídeo com pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 5 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de similaridade de sequência de aminoácido com a se- 10 quência de aminoácido de referência.

Alternativamente, conforme aqui usado, referência a um polipeptídeo da presente invenção e/ou referência à sequência de aminoácido de uma ou mais SEQ ID NOs. pode incluir um polipeptídeo com pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 15 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de amino- 20 ácido de referência.

Consequentemente, um polipeptídeo da presente invenção pode incluir certas variantes incluindo, por exemplo, polipeptídeos homólogos que se originam – biologicamente e/ou recombinantemente – de espécies ou linhagens microbianas outras que não a espécie ou linhagem microbiana a 25 partir da qual o polipeptídeo foi originalmente isolado e/ou identificado.

Por exemplo, um polipeptídeo da invenção pode incluir um polipeptídeo geralmente conhecido como formato acetiltransferase (PflB). Uma modalidade deste polipeptídeo é refletida na SEQ ID NO:353. Modalidades variantes são refletidas nas SEQ ID NO:354, SEQ ID NO:355, SEQ ID 30 NO:356, SEQ ID NO:357, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:360, SEQ ID NO:361, SEQ ID NO:362 e SEQ ID NO:363.

Como outro exemplo, um polipeptídeo da invenção pode incluir

um polipeptídeo geralmente conhecido como oligopeptídeo permeasse, proteína de ligação a peptídeo (Opp1A). Uma modalidade deste polipeptídeo é refletida na SEQ ID NO:364. Modalidades variantes são refletidas nas SEQ ID NO:365, SEQ ID NO:366, SEQ ID NO:367, SEQ ID NO:368, SEQ ID NO:369, SEQ ID NO:370, SEQ ID NO:371, SEQ ID NO:372, SEQ ID NO:373 e SEQ ID NO:374.

Como outro exemplo, um polipeptídeo da invenção pode incluir um polipeptídeo geralmente conhecido como proteína de ligação a transportador ABC de composto sideróforo (SirA). Uma modalidade deste polipeptídeo é refletida na SEQ ID NO:375. Modalidades variantes são refletidas nas SEQ ID NO:376, SEQ ID NO:377, SEQ ID NO:378, SEQ ID NO:379, SEQ ID NO:380, SEQ ID NO:381, SEQ ID NO:382, SEQ ID NO:383, SEQ ID NO:384 e SEQ ID NO:385.

Como outro exemplo, um polipeptídeo da invenção pode incluir um polipeptídeo algumas vezes referido aqui como SYN2. Uma modalidade deste polipeptídeo é refletida na SEQ ID NO:386. Modalidades variantes são refletidas nas SEQ ID NO:387, SEQ ID NO:388, SEQ ID NO:389, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:391, SEQ ID NO:392, SEQ ID NO:393, SEQ ID NO:394, SEQ ID NO:395 e SEQ ID NO:396.

Como outro exemplo, um polipeptídeo da invenção pode incluir um polipeptídeo geralmente conhecido como lipoproteína de ligação a hidroxamato férrico (FhuD). Uma modalidade deste polipeptídeo é refletida na SEQ ID NO:397. Modalidades variants são refletidas nas SEQ ID NO:398, SEQ ID NO:399, SEQ ID NO:400, SEQ ID NO:401, SEQ ID NO:402, SEQ ID NO:403, SEQ ID NO:404, SEQ ID NO:405, SEQ ID NO:406 e SEQ ID NO:407.

Como outro exemplo, um polipeptídeo da invenção pode incluir um polipeptídeo algumas vezes referido aqui como SYN1. Uma modalidade deste polipeptídeo é refletida na SEQ ID NO:408. Modalidades variants são refletidas nas SEQ ID NO:409, SEQ ID NO:410, SEQ ID NO:411, SEQ ID NO:412, SEQ ID NO:413, SEQ ID NO:414, SEQ ID NO:415, SEQ ID NO:416, SEQ ID NO:417 e SEQ ID NO:418.

Como outro exemplo, um polipeptídeo da invenção pode incluir um polipeptídeo geralmente conhecido como proteína de membrana de sistema de transporte de manganês (MntC). Uma modalidade deste polipeptídeo é refletida na SEQ ID NO:419. Modalidades variantes são refletidas nas
5 SEQ ID NO:420, SEQ ID NO:421, SEQ ID NO:422, SEQ ID NO:423, SEQ ID NO:424, SEQ ID NO:425, SEQ ID NO:426, SEQ ID NO:427, SEQ ID NO:428 e SEQ ID NO:429.

Como outro exemplo, um polipeptídeo da invenção pode incluir um polipeptídeo geralmente conhecido como lipoproteína transportadora
10 ABC de ferricromo (SstD). Modalidades deste polipeptídeo são refletidas nas SEQ ID NO:543, SEQ ID NO:544, SEQ ID NO:545, SEQ ID NO:546, SEQ ID NO:547, SEQ ID NO:548, SEQ ID NO:549, SEQ ID NO:550, SEQ ID NO:551 e SEQ ID NO:552.

Como outro exemplo, um polipeptídeo da invenção pode incluir
15 um polipeptídeo geralmente conhecido como transportador ABC de composto de ferro (FhuD2). Modalidades deste polipeptídeo são refletidas nas SEQ ID NO:553, SEQ ID NO:554, SEQ ID NO:555, SEQ ID NO:556, SEQ ID NO:557, SEQ ID NO:558, SEQ ID NO:559, SEQ ID NO:560, SEQ ID NO:561 e SEQ ID NO:562.

20 Um polipeptídeo da presente invenção pode ser também projetado para prover uma ou mais sequências adicionais tal como, por exemplo, a adição de sequências de codificação a aminoácidos C-terminais e/ou N-terminais adicionados que podem facilitar a purificação através de aprisionamento em colunas ou uso de anticorpos. Tais *tags* incluem, por exemplo,
25 *tags* ricas em histidina que permitem a purificação de polipeptídeos em colunas de níquel. Tais técnicas de modificação de gene e sequências adicionais adequadas são bem conhecidas na técnica de biologia molecular.

Um polipeptídeo da presente invenção pode ser também projetado de maneira que certos aminoácidos no C-terminal e/ou N-terminal sejam deletados. Por exemplo, uma diferença entre as sequências de aminoácido de SEQ ID NO:364 e SEQ ID NO:365 é que a SEQ ID NO:365 possui
30 uma adição de aminoácido 29 N-terminal que não está presente na sequên-

cia de aminoácido do polipeptídeo de referência da SEQ ID NO:364. Adições N-terminais exemplares similares, tipicamente variando de a partir de cerca de 20 aminoácidos a cerca de 35 aminoácidos, são aparentes quando uma pessoa compara, por exemplo, a sequência de aminoácido do peptídeo de referência da SEQ ID NO:353, SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:375, SEQ ID NO:386, SEQ ID NO:397, SEQ ID NO:408 ou SEQ ID NO:419 com certas modalidades variantes do respectivo polipeptídeo de referência. Outras adições e/ou deleções de aminoácido, ou no N-terminal ou no C-terminal, são possíveis.

10 Uma "modificação" de um polipeptídeo da presente invenção inclui polipeptídeos (ou análogos dos mesmos tais como, por exemplo, seus fragmentos) que são quimicamente ou enzimaticamente derivatizados em um ou mais aminoácido constituinte. Tais modificações podem incluir, por exemplo, modificações de cadeia lateral, modificações de estrutura principal e modificações N- e C-terminais tais como, por exemplo, acetilação, hidroxilação, metilação, amidação, e a ligação de porções carboidrato ou lipídeo, co-fatores, e similar, e suas combinações. Os polipeptídeos modificados da invenção podem reter a atividade biológica – tal como, por exemplo, atividade imunológica – do polipeptídeo não-modificado ou pode exibir uma atividade biológica reduzida ou aumentada.

20 Os polipeptídeos da presente invenção (incluindo seus análogos biologicamente ativos e suas modificações) incluem polipeptídeos nativos (de ocorrência natural), recombinantes e quimicamente ou enzimaticamente sintetizados. Por exemplo, um polipeptídeo da presente invenção pode ser preparado através do isolamento do polipeptídeo a partir de uma fonte natural ou pode ser preparado recombinantemente através de métodos bem conhecidos incluindo, por exemplo, preparação como proteínas de fusão em bactérias ou outras células hospedeiro.

30 Os polipeptídeos expressos por um micróbio de referência podem ser obtidos através do cultivo dos micróbios de referência sob condições com baixo teor de metal e o subsequente isolamento de um polipeptídeo através dos processos revelados aqui. Alternativamente, os polipeptí-

deos expressos por um micróbio de referência podem ser obtidos através da identificação de genes expressos em níveis maiores quando o micróbio é cultivado em condições com baixo teor de metal – isto é, genes regulados por metal. Os genes regulados por metal podem ser clonados e expressos e os polipeptídeos regulados por metal expressos podem ser identificados através dos processos descritos aqui. Um polipeptídeo candidato pode ser isolado de um micróbio ou identificado a partir de um micróbio, preferivelmente um micróbio gram-positivo, mais preferivelmente um membro da família *Micrococcaceae*, preferivelmente *Staphylococcus spp.*, mais preferivelmente *Staphylococcus aureus*.

Outros micróbios gram-positivos a partir dos quais polipeptídeos podem ser isolados e/ou identificados incluem *Corynebacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Erysipelothrix spp.*, *Kytococcus spp.* e *Micrococcus spp.*, *Mycobacterium spp.* e *Erysipelothrix spp.* Um polipeptídeo candidato pode ser também produzido usando técnicas enzimáticas ou químicas.

Similaridade de impressão digital de massa

Um polipeptídeo candidato pode ser avaliado através de análise de espectrometria de massa para determinar se o polipeptídeo candidato tem uma impressão digital de massa similar a um dos polipeptídeos expressos por um micróbio de referência e referido acima pelo peso molecular. Tipicamente, o polipeptídeo candidato pode ser isolado, por exemplo, através de separação do polipeptídeo candidato através de eletroforese em gel e excisão da porção do gel contendo o polipeptídeo candidato. Qualquer método de eletroforese em gel que separe polipeptídeos com base em características diferentes pode ser usado, incluindo eletroforese em gel 1 dimensional ou 2 dimensional, bem como separação cromatográfica líquida com base em, por exemplo, hidrofobicidade, pI ou tamanho. O polipeptídeo candidato pode ser fragmentado, por exemplo, através de digestão com uma protease. Preferivelmente, a protease pode clivar a ligação de peptídeo no lado carbóxi-terminal do aminoácido lisina e do aminoácido arginina, exceto quando o aminoácido seguindo a lisina ou a arginina é uma prolina. Um exemplo de tal protease é tripsina. Métodos para digestão de um polipeptídeo com tripsina

são rotina e conhecidos na técnica. Um exemplo de tal método é revelado no Exemplo 13.

Métodos para análise espectrométrica de massa de polipeptídeos são rotina e conhecidos na técnica e incluem, mas não estão limitados a, espectroscopia de massa por tempo de voo com dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI-TOF MS). Tipicamente, uma mistura contendo os fragmentos de polipeptídeo obtidos de um polipeptídeo candidato é misturada com uma matriz que funciona para transformar a energia de *laser* para a amostra e produzir fragmentos de polipeptídeo ionizados, preferivelmente monoisotópicos. Exemplos de matrizes que podem ser usadas incluem, por exemplo, ácido sinapínico ou ácido ciano-4-hidroxicinâmico. Um exemplo de um método para a análise de polipeptídeos através de MALDI-TOF MS é descrito no Exemplo 13. Os fragmentos de polipeptídeo ionizados são separados de acordo com sua razão m/z e detectados para dar um espectro de razão m/z versus intensidade. O espectro inclui valores m/z que representam os fragmentos de polipeptídeo derivados do polipeptídeo candidato. Para qualquer dado polipeptídeo, a quantidade de cada fragmento de polipeptídeo resultante de uma digestão com tripsina deve ser equimolar. No entanto, é conhecido que digestão com tripsina não é sempre 100% eficiente, por exemplo, alguns sítios são mais eficientemente clivados. Desta maneira, quando MALDI-TOF MS é usada para determinar valores m/z , a intensidade de cada valor m/z é tipicamente não-idêntica. Em geral, um espectro tem um nível de base de ruído presente na maior parte do eixo x (isto é, o eixo tendo os valores das razões m/z). Este nível de base de ruído varia dependendo das condições de atividade e da máquina usada, e é facilmente identificado através de inspeção visual do espectro. Um valor m/z é geralmente considerado representar um fragmento de polipeptídeo quando a intensidade é pelo menos 2 vezes maior, pelo menos 3 vezes maior ou pelo menos 4 vezes maior do que o nível de base de ruído. O espectro geralmente inclui outros valores m/z que são artefatos resultantes de, por exemplo, digestão incompleta, digestão excessiva, outros polipeptídeos que podem estar presentes na mistura ou a protease usada para digerir o polipeptídeo

incluindo valores m/z resultantes de autólise da protease. Este método de digestão de um polipeptídeo com uma protease é reconhecido na técnica como resultando em uma impressão digital de massa de maior especificidade que pode ser usada para caracterizar precisamente o polipeptídeo e distingui-lo de outros polipeptídeos.

Neste aspecto da invenção, quando um polipeptídeo candidato é analisado através de espectroscopia de massa, preferivelmente ambos o polipeptídeo candidato e o polipeptídeo do micróbio de referência são preparados e analisados juntos, desta maneira diminuindo quaisquer artefatos potenciais resultantes de diferenças em manuseamento de amostra e condições de atividade. Preferivelmente, todos os reagentes usados para preparar a analisar os dois polipeptídeos são iguais. Por exemplo, o polipeptídeo do micróbio de referência e o polipeptídeo candidato são isolados sob substancialmente as mesmas condições, fragmentados sob substancialmente as mesmas condições e analisados através de MALDI-TOF MS na mesma máquina sob substancialmente as mesmas condições. Um polipeptídeo candidato pode ser considerado ser "estruturalmente similar" a um polipeptídeo de referência se ele exibir uma impressão digital de massa possuindo pelo menos 80%, pelo menos 90%, pelo menos 95% ou substancialmente todos dos valores m/z presentes no espectro do polipeptídeo do micróbio de referência e acima do nível de ruído de base estiverem também presentes no espectro do polipeptídeo candidato. (Vide, por exemplo, Publicação do Pedido de Patente Norte-Americano No. 2006/0233824 A1).

Em outro aspecto, um polipeptídeo pode ser considerado ser um polipeptídeo da presente invenção se ele tiver um peso molecular de um polipeptídeo de referência descrito na Tabela 2, 3, 4 ou 5 e tiver uma impressão digital de massa que inclua uma subpopulação incluindo pelo menos uma porcentagem especificada dos fragmentos de polipeptídeo do polipeptídeo de referência conforme listado na Tabela 2, 3, 4 ou 5. Por exemplo, um polipeptídeo da presente invenção inclui um polipeptídeo de 88 kDa e uma impressão digital de massa que inclui uma porcentagem especificada de fragmentos de polipeptídeo tendo massas de HVDVR (SEQ ID NO: 1), YS-

YER (SEQ ID NO: 2), IIGDYRR (SEQ ID NO: 3), IFTDYRK (SEQ ID NO: 4),
ELKELGQK (SEQ ID NO: 5), YAQVKPIR (SEQ ID NO: 6), QMQFFGAR
(SEQ ID NO: 7), SMQPFGGIR (SEQ ID NO: 8), VSGYAVNFIK (SEQ ID NO:
9), NHATAWQGFK (SEQ ID NO: 10), LWEQVMQLSK (SEQ ID NO: 11),
5 SLGKEPEDQNR (SEQ ID NO: 12), DGISNTFSIVPK (SEQ ID NO: 13), AG-
VITGLPDAYGR (SEQ ID NO: 14), TSTFLDIYAER (SEQ ID NO: 15),
SMQPFGGIRMAK (SEQ ID NO: 16), THNQGVFDAYS R (SEQ ID NO: 17),
KAGVITGLPDAYGR (SEQ ID NO: 18), TLLYAINGGKDEK (SEQ ID NO: 19),
IEMALHDTEIVR (SEQ ID NO: 20), AGEPFAPGANPMHGR (SEQ ID NO:
10 21), VALYGVDFLMEEK (SEQ ID NO: 22), KTHNQGVFDAYS R (SEQ ID NO:
23), YGFDLSRPAENFK (SEQ ID NO: 24), TSSIQYENDDIMR (SEQ ID NO:
25), KAGEPFAPGANPMHGR (SEQ ID NO: 26), RVALYGVDFLMEEK (SEQ
ID NO: 27), LWEQVMQLSKEER (SEQ ID NO: 28), MLETNKNHATAWQGFK
(SEQ ID NO: 29), MHDFNTMSTEMSEDVIR (SEQ ID NO: 30), YGNND-
15 DRVDDIAVDLVER (SEQ ID NO: 31), ETLIDAMEHPPEEYPQLTIR (SEQ ID
NO: 32), YAQVKPIRNEEGLVVDFFEIEGDFPK (SEQ ID NO: 33).

A impressão digital de massa de um polipeptídeo candidato po-
de ser determinada através de um método espectrométrico de massa, por
exemplo, através de MALDI-TOF MS. A impressão digital de massa de um
20 polipeptídeo candidato terá geralmente fragmentos de polipeptídeo adicio-
nais e, então, pode ter valores m/z adicionais outros que não aquelas lista-
dos para um polipeptídeo na Tabela 2, 3, 4 ou 5. Quando o polipeptídeo
candidato está sendo comparado com um polipeptídeo na Tabela 2, 3, 4 ou
5, o polipeptídeo candidato pode ser isolável de um micróbio, preferivelmen-
25 te um micróbio gram-positivo, mais preferivelmente um membro da família
Micrococcaceae, preferivelmente *Staphylococcus spp.*, mais preferivelmente
Staphylococcus aureus. Outros micróbios gram-positivos incluem *Coryne-
bacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Erysipelothrix spp.*, *Kyfooccus spp.*, *Lis-
teria spp.*, *Micrococcus spp.*, and *Mycobacterium spp.* e *Erysipelothrix spp.*

30 Um polipeptídeo candidato pode ser obtido através do cultivo de
um micróbio sob condições de baixo teor de metal e o isolamento subse-
quente de um polipeptídeo através dos processos descritos aqui. Alternati-

vamente, um polipeptídeo candidato pode ser obtido através de expressão recombinante de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo candidato.

É bem conhecido na técnica que modificações de aminoácido podem ser acidentalmente introduzidas durante o manuseamento da amostra, tal como oxidação, e formação de derivados de carbamidometila. Ainda, esses tipos de modificações alteram o valor m/z de um fragmento de polipeptídeo. Por exemplo, se um fragmento de polipeptídeo contiver uma metionina que é oxidada, o valor m/z será aumentado em 16 com relação ao mesmo fragmento que não contém a metionina oxidada. Desta maneira, aqueles fragmentos de polipeptídeo na Tabela 2, 3, 4 ou 5 tendo a notação "oxidação (M)" têm um valor m/z que é aumentado em 16 com relação ao mesmo fragmento que não contém a metionina oxidada. É compreendido que os fragmentos de polipeptídeo da Tabela 2, 3, 4 ou 5 pode ser modificado durante o manuseamento da amostra.

15 Similaridade de sequência de polinucleotídeo e identidade de sequência de polinucleotídeo

Os polipeptídeos da invenção podem ser também identificados em termos dos polinucleotídeos que codificam o polipeptídeo. Desta maneira, a invenção inclui polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo da invenção ou hibridizam, sob condições de hibridização padrão, para um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da invenção, e os complementos de tais sequências de polinucleotídeo.

Conforme aqui usado, referência a um polinucleotídeo da presente invenção e/ou referência à sequência de ácido nucleico de uma ou mais SEQ ID NOs. podem incluir polinucleotídeos tendo uma identidade de sequência de pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com uma sequência de polinucleotídeo de referência identificada.

Tabela 2. Características de polipeptídeos obtidos de *S. aureus* isolato ATCC 19636

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
P23	88	625,4	HVDVR	1
		717,3	YSYER	2
		892,5	IIGDYRR	3
		942,5	IFTDYRK	4
		944,5	ELKELGQK	5
		974,6	YAQVKPIR	6
		984,5	QMQLFFGAR	7
		992,5	SMQPFGGIR	8
		1097,6	VSGYAVNFIK	9
		1159,5	NHATAWQGFK	10
		1261,7	LWEQVMQLSK	11
		1272,7	SLGKEPEDQNR	12
		1277,7	DGISNTFSIVPK	13
		1289,7	AGVITGLPDAYGR	14
		1315,7	TSTFLDIYER	15
		1322,7	SMQPFGGIRMAK	16
		1394,7	THNQGVFDAYS	17
		1417,8	KAGVITGLPDAYGR	18
		1421,8	TLLYAINGGKDEK	19
		1426,8	IEMALHDTEIVR	20
		1508,8	AGEPFAGANPMHGR	21

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1513,9	VALYGVDFLMEEK	22
		1522,8	KTHNQGVFDAYS	23
		1543,9	YGFDSLSPAENFK	24
		1571,8	TSSIQYENDDIMR	25
		1636,9	KAGEPFAPGANPMHGR	26
		1670,0	RVALYGVDFLMEEK	27
		1676,0	LWEQVMQLSKEER	28
		1876,2	MLETNKNHATAWQGFK	29
		2043,1	MHDFNTMSTEMSEVIR	30
		2078,2	YGNNDDRVDIAVDLVER	31
		2285,5	ETLIDAMEHPPEEYPLTIR	32
		2892,9	YAQVKPIRNEEGLVDFEIEGDFPK	33
P25	55	783,6	LHSWLK	34
		911,7	KLHSLWK	35
		937,6	TYTFHLR	36
		996,6	KFDGTGPFK	37
		1025,6	QAIGHMVNR	38
		1063,6	KWDVSEDK	39
		1185,6	IYNSIDDAFK	40
		1277,6	NLEMAMYDYK	41
		1324,7	ENKQTYTTVK	42
		1346,7	AESLLDEAGWKK	43

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1381,8	TVRQAIGHMVNR	44
		1394,8	TYTFHLRDDVK	45
		1400,7	KGETNFAFTDDR	46
		1419,7	FHDGTPFDADAVK	47
		1422,8	NVTDINFDMPTR	48
		1428,8	DKIYNSIDDAFK	49
		1483,8	EQAELYLQAEFKK	50
		1509,8	VMPAGETAFLSMKK	51
		1547,9	FHDGTPFDADAVKK	52
		1550,9	NVTDINFDMPTRK	53
		1559,9	LNINGETSDKIAER	54
		1788,1	EILDGQEKPATQLFAK	55
		1930,1	GSSSQKEQAEYLQAEFK	56
		1946,0	DESADFNKNDQYWGEK	57
		2100,4	IAKEILDGQEKPATQLFAK	58
		2239,3	VSFTQSQYELPFNEMQYK	59
		2493,5	EAYQPALAEAMP RP YV FVSPK + Oxidation (M)	60
		2900,6	DIGDMNPHVYGGMSAESMIYEPLVR + 2 Oxidação (M)	61
		2916,6	DIGDMNPHVYGGMSAESMIYEPLVR + 3 Oxidação (M)	62
P26	38	993,6	IVYVGADEK	63
		996,7	QALNNPVLK	64
		1237,7	ETVKIENNYK	65

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1272,7	ENPDVILAMDR	66
		1502,0	IAATKPEVIFISGR	67
		1507,9	NAVLDYGALDVMK	68
		1523,9	ALPNFLEFKDDK	69
		1559,9	LWYFAAGSTTTIK	70
		1716,0	FGGLVYDTLGFNAVDK	71
		1737,0	IYVGADEKNLIGSMK	72
		1844,1	FGGLVYDTLGFNAVDKK	73
		1929,1	GRFGGLVYDTLGFNAVDK	74
		1998,2	TVMYLLVNEGELSTFGPK	75
		2234,4	EVNFDKIAATKPEVIFISGR	76
		3143,8	VSNSNHGQNVSNKYVKNENPDVILAMDR	77
P27	37	699,5	FEYIK	78
		729,4	DAWPLK	79
		792,5	ASVNFNR	80
		852,4	VYDQLSK	81
		987,5	HAMGTTEIK	82
		1008,5	LIDDLYEK	83
		1020,5	YKDAWPLK	84
		1074,5	EKEAEDLLK	85
		1083,6	LKPDLVASK	86
		1169,5	FEYIKNDLK	87

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1182,5	KTESEWTSSK	88
		1184,5	YDDKVAAFQK	89
		1223,5	NEKVDQLSK	90
		1278,6	IAPTVSTDTVFK	91
		1497,6	TESEWTSSKEWK	92
		1502,7	DAWPLKASVWVNR	93
		1558,8	QVDNGKDIQLTSK	94
		1605,8	LIDDLYEKLNIEK	95
		1623,8	IVGQEPAPNLEEISK	96
		1712,8	ESIPLMNADHIFVK	97
		1800,9	IYAGGYAGEILNDLGFK	98
		1957,0	IYAGGYAGEILNDLGFKR	99
		2252,0	NNQVSDDLDEITWNLGGYK	100
P28	36	3383,9	RWVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQKPK	101
		646,4	DVWAR	102
		725,5	IIKPVR	103
		1068,4	IGDYTSVGTR	104
		1185,5	KQPNLEEISK	105
		1327,6	LKPDLIADSSR	106
		1343,6	VDIVDRDVWAR	107
		2080,9	GPYLQLDTEHLADLNPER	108
		2438,1	AGLLAHPNYSYVGQFLNELGFK	109

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		2789,4	IVVLEYSFADALAAALDVKPVGIADDGK	110
P29	35	760,5	AGWAEVK	111
		1012,6	TVDIPKDPK	112
		1107,6	KDWEETAK	113
		1204,7	VAPTVVVDYNK	114
		1238,6	YLEQQEMLGK	115
		1244,6	LYTYGDNWGR	116
		1259,7	IADVAPTYAGGLK	117
		1281,7	GGEVLYQAFGLK	118
		1516,8	AGWAEVKQEEIEK	119
		1683,9	LGANIVAVNQVDQSK	120
		1877,1	EKPDLIIVYSTDKDIK	121
		1884,0	AIGQDATVSLDFDCKK	122
		2227,1	VDAGTYWYNDPYTLDFMR	123
		2781,4	YAGDYIVSTSEKPTPGYESTNMWVK	124
P30	33	834,5	QAIEFVK	125
		864,5	YIAQLEK	126
		946,5	QGTPEQMR	127
		962,5	QAIEFVKK	128
		976,5	DKFNDIPK	129
		1054,5	AMITSEGAFK	130
		1202,5	SNIETVHGSMK	131

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1268,6	HLLVETSVDKK	132
		1443,6	DIFGEVYTDSIGK	133
		1450,7	TIQQTIFIDNKK	134
		1454,7	WTTNSILYDMAK	135
		1571,7	KDIFGEVYTDSIGK	136
		1593,7	QDPHAWLSLDNGIK	137
		1818,9	DVKPIYLNAGEEGNKDK	138
		1836,9	DKQDPHAWLSLDNGIK	139
		1911,9	QYGITPGYWEINTEK	140
		2582,3	LTDADVILYNGLNLETGNGWFEK	141
		2710,2	KLTDADVILYNGLNLETGNGWFEK	142
		2942,4	NVGGDNVDIHSIVPGQDPHEYEYKPK	143

1. Peso molecular conforme determinado através de SDS-PAGE.

2. O valor m/z de um fragmento de polipeptídeo pode ser convertido em massa subtraindo 1 do valor m/z. Cada massa inclui uma faixa de mais ou menos 300 partes por milhão (ppm) ou mais ou menos 1 Da.

Tabela 3. Características de polipeptídeos obtidos de *S. aureus* isolato SAAV1.

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
P33A	55	783,4	LHSWLK	144
		911,5	KLHSWLK	145
		937,5	TYTFHLR	146
		996,5	KFDGTGPFK	147
		1025,5	QAIGHMVNR	148
		1039,4	NDQYWGEK	149
		1178,5	GTDSLDKDSLK	150
		1185,5	IYNSIDDAFK	151
		1222,6	DKYTVLNLK	152
		1229,5	ISTLIDNVKVK	153
		1346,6	AESLLDEAGWKK	154
		1355,5	EQAEYLQAEFK	155
		1381,6	VMPAGETAFLSMK	156
		1400,5	KGETNFAFTDDR	157
		1419,6	FHDGTPFDADAVK	158
		1422,6	NVTDINFDMPTR	159
		1483,6	EQAEYLQAEFKK	160
		1547,7	FHDGTPFDADAVKK	161
		1550,6	NVTDINFDMPTRK	162
		1559,7	LNINGETSDKIAER	163

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1787,9	EILDGQEKPATQLFAK	164
		1945,8	DESADFNKNDQYWGEK	165
		2239,0	VSFTQSQYELPFNEMQYK	166
		2354,1	QIDDEGIFIPISHGSMTVVAPK	167
		2868,1	DIGDMNPHVYGGSMSAESMIYEPLVR	168
P33B	55	895,4	FPYAANGR	169
		904,5	ALLHASHR	170
		1045,5	EEGLAIKASK	171
		1384,5	GEAYFVDNNSLR	172
		1435,7	TIEADYVLTVGR	173
		1669,8	RPNTDELGLEELGVK	174
		1841,0	NAIATGSRPIEIPNFK	175
		2179,2	TSISNIYAIGDIVPGLPLAHK	176
		2546,2	FVEAQHSENLGVIAESVSLNFQK	177
		2587,3	VVGDFPIETDTIVIGAGPGGYVAAIR	178
P35	37	699,4	FEYIK	179
		729,4	DAWPLK	180
		792,4	ASVAVNFR	181
		852,4	VYDQLSK	182
		1008,4	LIDDLYEK	183
		1020,4	YKDAWPLK	184
		1074,4	EKEAEDLLK	185

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1083,5	LKPDLVASK	186
		1169,5	FEYKNDLK	187
		1182,4	KTESEWTSSK	188
		1184,4	YDDKVAAFQK	189
		1278,5	IAPTVSTDTVFK	190
		1558,7	QVDNGKDIQLTSK	191
		1623,7	IVGQEPAPNLEEISK	192
		1712,7	ESIPLMNADHIFVVK	193
		1800,7	IYAGGYAGEIINDLGFK	194
		1956,8	IYAGGYAGEIINDLGFKR	195
		2251,9	NNQVSDDLDEITWNLGGYK	196
P38	33	3227,5	WTLYQGATDVAVSLGKPKVGVAVESWTQKPK	197
		864,5	YIAQLEK	198
		946,4	QGTPEQMR	199
		976,5	DKFNDIPK	200
		1054,5	AMITSEGAFK	201
		1146,5	FNDIPKEQR	202
		1268,6	HLLVETSVDKK	203
		1322,5	TIQQTFFIDNDK	204
		1443,6	DIFGEVYTD SIGK	205
		1450,6	TIQQTFFIDNDKK	206
		1454,6	VVTTNSILYDMAK	207

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1593,7	QDPHAWLSLDNGIK	208
		1818,9	DVKPIYLNNGEENKDK	209
		1836,8	DKQDPHAWLSLDNGIK	210
		1911,9	QYGITPGYIWEINTEK	211
		2942,4	NVGGDNVDIHSIVPVGQDPHEYEVKPK	212

1. Peso molecular conforme determinado através de SDS-PAGE.

2. O valor m/z de um fragmento de polipeptídeo pode ser convertido em massa subtraindo 1 do valor m/z. Cada massa inclui uma faixa de mais ou menos 300 partes por milhão (ppm) ou mais ou menos 1 Da.

Tabela 4. Características de polipeptídeos obtidos de *S. aureus* isolato 2176

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
P478	88	736,35	IIGDYR	213
		814,49	IFTDYR	214
		942,42	IFTDYRK	4
		945,36	TGNTPDGRK	215
		974,40	YAQVKPIR	6
		984,27	QMQLFFGAR	7
		992,41	SMQPFGGIR	8
		1087,31	EQQLDVISR	216
		1097,31	VSGYAVNFIK	9
		1159,37	NHATAWQGFK	10
		1261,37	LWEQVMQLSK	11
		1289,46	AGVITGLPDAYGR	14
		1315,42	TSTFLDIYAER	15
		1322,39	LREELSEQYR	217
		1394,37	THNQGVFDAYSR	17
		1417,52	KAGVITGLPDAYGR	18
		1426,36	IEMALHDTEIVR	20
		1487,39	NHATAWQGFKNR	218
		1508,42	AGEPFAPGANPMHGR	21
		1513,52	VALYGVDFLMEEK	22

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1543,43	YGFDLRPAENFK	24
		1571,50	TSSIQYENDDIMR	25
		1636,56	KAGEPFAPGANPMHGR	26
		1859,80	DLETIVGVQTEKPFKR	219
		1876,77	TMATGIAGLSVAADSLSAIK	220
		2042,57	MHDFNTMSTEMSEVIR	30
		2077,68	YGNDDRVDDIAVDLVER	31
		2158,88	AGVITeseVQEIIDHFIMK	221
		2284,90	ETLIDAMEHPEEYPQLTIR	32
		2575,08	FLHSLDNLGPAPEPNTVLWSVR	222
		2628,01	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFK	223
		2756,06	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFKK	224
		3262,33	VASTITSHDAGYLDKDLLETIVGVQTEKPFK	225
P479	80	625,27	HVDVR	1
		736,26	IIGDYR	226
		814,22	IFTDYR	227
		942,27	IFTDYRK	4
		974,26	YAQVKPIR	6
		984,18	QMQLFFGAR	7
		992,23	SMQPFGGIR	8
		1087,16	EQQLDVISR	228
		1097,24	VSGYAVNFIK	9

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1159,12	NHATAWQGFK	10
		1243,14	VDDIAVDLVER	229
		1261,22	LWEQVMQLSK	11
		1272,24	SLGKEPEDQNR	12
		1277,18	DGISNTFSIVPK	13
		1289,21	AGVITGLPDAYGR	14
		1315,19	TSTFLDIYAER	15
		1322,21	LREELSEQYR	230
		1394,16	THNQGVFDAYS	17
		1417,32	KAGVITGLPDAYGR	18
		1426,23	IEMALHDTEIVR	20
		1487,19	NHATAWQGFKNGR	231
		1508,25	AGEPFAPGANPMHGR	21
		1513,21	VALYGVDFLMEEK	22
		1522,25	KTHNQGVFDAYS	23
		1543,26	YGFDLRPAENFK	24
		1571,23	TSSIQYENDDIMR	25
		1636,29	KAGEPFAPGANPMHGR	26
		1703,43	DLETIVGVQTEKPFK	232
		1751,45	EAVQWLYLAYLAAIK	233
		1859,53	DLETIVGVQTEKPFKR	234
		1876,50	TMATGIAGLSVAADSLSAIK	235

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1936,37	NEEGLVDFEIEGDFPK	236
		2042,43	MHDFNTMSTEMSEVIR	30
		2077,45	YGNDDRVDIAVDLVER	31
		2158,57	AGVITeseVQEIIDHFIMK	237
		2284,61	ETLIDAMEHPPEEYPQLTIR	32
		2574,77	FLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVR	238
		2627,61	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFK	239
		2755,70	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFK	240
		2907,65	EFIQLNYTLYEGNDSFLAGPTEATSK	241
		3261,91	VASTITSHDAGYLDKDLLETIVGVQTEKPFK	242
		3421,02	TPDYNELFSGDPTWWTESIGGVGIDGRPLVTK	243
P480	65	625,35	HVDVR	1
		717,38	YSYER	2
		733,42	LPDNFK	244
		736,44	IIGDYR	245
		814,33	IFTDYR	246
		853,31	YGNDDR	247
		942,33	IFTDYRK	4
		944,39	ELKELGQK	5
		974,52	YAQVKPIR	6
		984,36	QMQFFGAR	7
		992,44	SMQFFGGIR	8

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1049,44	TLLYAINGGK	248
		1087,43	EQQLDVISR	249
		1097,51	VSGYAVNFIK	9
		1159,52	NHATAWQGFK	10
		1289,53	AGVITGLPDAYGR	14
		1315,51	TSTFLDIYAER	15
		1322,46	LREELSEQYR	250
		1394,50	THNQGVFDAYS	17
		1417,65	KAGVITGLPDAYGR	18
		1442,56	IEMALHDTEVR + Oxidação (M)	251
		1467,60	VSGYAVNFIKLTR	252
		1522,61	KTHNQGVFDAYS	23
		1524,55	AGEPFAPGANPMHGR + Oxidação (M)	253
		1529,64	VALYGVDFLMEEK + Oxidação (M)	254
		1543,62	YGFDLSPAEENFK	24
		1652,68	KAGEPFAPGANPMHGR + Oxidação (M)	255
		1671,76	TSTFLDIYAERDLK	256
		1766,76	VDDIAVDLVERFMTK + Oxidação (M)	257
		1876,86	TMATGIAGLSVAADSLSAIK	258
		2077,93	YGNNDDRVDIADLVER	31
		2225,07	DSEHTMSVLTITSNVYGGK + Oxidação (M)	259
		2575,33	FLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVR	260

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		2628,25	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFK	261
		2748,36	NLTSMLDGYAMQCCHHLNINVFNR	262
		2756,63	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFKK	263
		3001,02	DEKSGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFK	264
P481	55	3420,75	TPDYNELFSGDPTWVTESIGGVGIDGRPLVTK	265
		634,33	AKSNSK	266
		883,24	TFYPEAR	267
		1014,24	QFWGHLVK	268
		1131,17	WIPLMMKGR	269
		1207,21	VINEEFEISK	270
		1324,10	NEDWQLYTAGK	271
		1360,28	TLLFGPFANVGPK	272
		1386,31	LDRPAIESSNER	273
		1565,30	IDEGTDVNFGELTR	274
		1584,34	EFINPLPHISYVR	275
		1699,29	EIEPDWNIHVYER	276
		1744,36	EPPGTPPMTVPHLDTR	277
		2046,52	QVTDYVFIGAGGGAIPLLQK	278
		2189,43	TFYPEARNEDWQLYTAGK	279
P482	37	2806,58	HLGGFPISSQFLACTNPQVIEQHDAK	280
		699,28	FEYIK	281
		729,26	DAWPLK	282

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		792,33	ASVWNFR	283
		852,28	VYDQLSK	284
		1008,30	LIDDLYEK	285
		1020,31	YKDAWPLK	286
		1083,43	LKPDLVASK	287
		1278,36	IAPTVSTDTVFK	288
		1623,44	IVGQEPAPNLEEISK	289
		1712,62	ESIPLMNADHIFVVK	290
		1800,61	IYAGGYAGEILNDLGFK	291
		1956,77	IYAGGYAGEILNDLGFKR	292
		2251,77	NNQVSDDLDEITWNLGGYK	293
P483	36	3227,44	WTLYQGATDVAVSLGKPVGAVESWTQKPK	294
		646,50	DVWAR	295
		672,41	KLNAVK	296
		716,41	VDIVDR	297
		725,61	IKPVR	298
		842,50	IAPTLCLK	299
		850,47	QNINSFK	300
		1068,50	IGDYTSVGTR	301
		1075,42	MIIMTDHAK + Oxidação (M)	302
		1185,53	KQPNLEEISK	303
		1327,59	LKPDLIADSSR	304

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1343,58	VDIVDRDVMWAR	305
		1592,76	LKPDLIADSSRHK	306
		2081,00	GPYLQLDTEHLADLNPER	307
		2438,24	AGLLAHPNYSYVGQFLNELGFK	308
		2789,48	IVLEYSFADALAALDVKPVGIADDGK	309
		2917,60	IVLEYSFADALAALDVKPVGIADDGKK	310
P484	35	857,38	AAIDLAGR	311
		1022,23	NIEADTGMR + Oxidação (M)	312
		1056,32	VVDANIAAQR	313
		1075,36	ADIDLPPER	314
		1285,44	LVGGAGEETIAR	315
		1435,44	AMAVATEQEMKAR	316
		1632,50	HHTEVLENPDNISK	317
		1813,65	VVEAESEVPLAMAEALR	318
		1887,67	VIETPFIAGVAMNGIEVK	319
		2299,85	AGLALTTNQLESHYLAGGNVDR	320
		2806,95	TVLSKGLDSGTAFEILSIDIADVDISK	321
		3337,42	AGLALTTNQLESHYLAGGNVDRVVDANIAAQR	322
P485	33	625,28	ADYEK	323
		864,28	YIAQLEK	324
		946,23	QGTPEQMR	325
		1045,26	ALEQAGKSLK	326

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1268,35	HLLVETSVDKK	327
		1443,34	DIFGEVYTDSIGK	328
		1450,40	TIQQTFFIDNDKK	329
		1454,37	VVTTNSILYDMAK	330
		1571,45	KDIFGEVYTDSIGK	331
		1576,44	DVKPIYLNAGEEGNK	332
		1593,47	QDPHAWLSLDNGIK	333
		1819,59	DVKPIYLNAGEEGNKDK	334
		1836,62	DKQDPHAWLSLDNGIK	335
		1911,66	QYGITPGYIWEINTEK	336
		2172,83	VIAVSKDVKPIYLNAGEEGNK	337
		2582,00	LTDADVILYNGLNLETGNGWFEK	338
P486	32	2942,26	NVGGDNVDIHSIVPGQDPHEYEYVVKPK	339
		625,42	ADYEK	340
		864,41	YIAQLEK	341
		1268,48	HLLVETSVDKK	342
		1443,49	DIFGEVYTDSIGK	343
		1450,53	TIQQTFFIDNDKK	344
		1454,61	VVTTNSILYDMAK	345
		1576,64	DVKPIYLNAGEEGNK	346
		1593,57	QDPHAWLSLDNGIK	347
		1818,77	DVKPIYLNAGEEGNKDK	348

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1836,78	DKQDPHAWLSLDNGIK	349
		1911,81	QYGITPGYIWEINTEK	350
		2582,18	LTDADVILYNGLNLETGNGWFEK	351
		2942,32	NVGGDNVDIHSIVPVGQDPHEYEKPK	352

1. Peso molecular conforme determinado através de SDS-PAGE.

2. O valor m/z de um fragmento de polipeptídeo pode ser convertido em massa subtraindo 1 do valor m/z. Cada massa inclui uma faixa de mais ou menos 400 partes por milhão (ppm) ou 1 Dalton.

Tabela 5. Características de polipeptídeos obtidos de *S. aureus* isolato bovino 1477.

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
P487	88	717,39	YSYER	2
		736,52	IIGDYR	583
		814,46	IFTDYR	584
		942,46	IFTDYRK	4
		974,54	YAQVKPIR	6
		984,41	QMQLFFGAR	7
		992,40	SMQPFGGIR	8
		1087,49	EQQLDVISR	585
		1097,50	VSGYAVNFIK	9
		1159,39	NHATAWQGFK	10
		1261,45	LWEQVMQLSK	11
		1272,50	SLGKEPEDQNR	12
		1277,50	DGISNTFSIVPK	13
		1289,54	AGVITGLPDAYGR	14
		1315,54	TSTFLDIYAER	15
		1322,53	LREELSEQYR	586
		1394,50	THNQGVFDAYS	17
		1417,62	KAGVITGLPDAYGR	18
		1426,65	IEMALHDTEIVR	20
		1508,59	AGEPFAPGANPMHGR	21

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1522,61	KTHNQGVFDAYSR	23
		1543,68	YGFDLSPAENFK	24
		1877,74	TMATGIAGLSVAADSLSAIK	587
		2077,86	YGNNDDRVDDIAVDLVER	31
		2159,08	AGVITeseVQEIIDHFIMK	588
		2285,07	ETLIDAMEHPPEEYPQLTIR	32
		2575,32	FLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVR	589
		2628,24	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFK	590
		2756,41	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFKK	591
P488	80	3262,68	VASTITSHDAGYLDKDLLETIVGVQTEKPFK	592
		625,49	HVDVR	1
		814,54	IFTDYR	593
		942,66	IFTDYRK	4
		974,69	YAQVKPIR	6
		984,59	QMQLFFGAR	7
		992,55	SMQPFGGIR	8
		1159,64	NHATAWQQGFK	10
		1261,63	LWEQVMQLSK	11
		1272,74	SLGKEPEDQNR	12
		1277,69	DGISNTFSIVPK	13
		1289,76	AGVITGLPDAYGR	14
		1315,73	TSTFLDIYAER	15

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1322,72	SMQPFGGIRMAK	16
		1394,73	THNQGVFDAYSR	17
		1417,86	KAGVITGLPDAYGR	18
		1422,76	TLLYAINGGKDEK	19
		1426,80	IEMALHDTEIVR	20
		1508,82	AGEPFAPGANPMHGR	21
		1513,80	VALYGVDFLMEEK	22
		1543,82	YGFDLSPAEENFK	24
		1571,82	TSSIQYENDDIMR	25
		1703,99	DLETIVGVQTEKPFK	594
		1860,23	DLETIVGVQTEKPFKR	595
		1877,07	TMATGIAGLSVAADSLSAIK	596
		1937,09	NEEGLVDFEIEGDFPK	597
		2078,13	YGNNDRRVDDIAVDLVER	31
		2575,56	FLHSLDNLGPAPEPNTVLWSVR	598
		2628,30	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFK	599
		2908,63	EFIQLNYTLYEGNDSFLAGPTEATSK	600
P489	65	733,67	IVKFAR	601
		944,71	ELKELGQK	5
		974,79	YAQVKPIR	6
		984,69	QMQFFGAR	7
		1049,83	TLLYAINGGK	602

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1087,78	EQQLDVISR	603
		1097,79	VSGYAVNFIK	9
		1243,80	VDDIAVDLVER	604
		1272,82	SLGKEPEDQNR	12
		1289,87	AGVITGLPDAYGR	14
		1299,92	LPDNFKTYCAK	605
		1315,83	TSTFLDIYAER	15
		1322,84	SMQPFGGIRMAK	16
		1390,93	DQKGALSSLSVAK	606
		1394,84	THNQGVFDAYSR	17
		1577,94	VASTITSHDAGYLDK	607
		1637,09	KAGEPFAPGANPMHGR	26
		1704,16	DLETIVGVQTEKPFK	608
		2030,42	MSIKTSSIQYENDDIMR	608
		2078,34	YGNNDDRVDIAVDLVER	31
		2284,60	ETLIDAMEHPPEEYPQLTIR	32
		2575,77	FLHSLDNLGPAPEPNTVLWSVR	610
		2628,64	SGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFK	611
P490	55	883,81	TFYPEAR	612
		1014,87	QFWGHLVK	613
		1131,97	WIPLMMKGR	614
		1207,99	VINEEFEISK	615

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
		1231,97	YSFDQVIMTK	616
		1325,02	NEDWQLYTAGK	617
		1361,17	TLLFGPFANVGPVK	618
		1362,14	GREDNPGIMASK + Oxidation (M)	619
		1387,14	LDRPAIESSNER	620
		1481,24	NEDWQLYTAGKR	621
		1566,28	IDEGTDVNFGELTR	622
		1585,34	EFINPLPHISYVR	623
		1700,36	EIEPDWNIHVYER	624
		1761,49	EPPGTPMTVPHLDTR + Oxidation (M)	625
		2047,67	QVTDYVFIGAGGAIPLLQK	626
		2208,82	VYGKEPPGTPMTVPHLDTR + Oxidation (M)	627
		2865,21	HLLGGFPISGGQLACTNPQVIEQHDAK	628
P492	36	857,57	AAIDLAGR	629
		1056,59	VVDANIAAQR	630
		1075,61	ADIDLPPER	631
		1285,74	LVGGAGEETIAR	632
		1632,95	HHTEVLENPDNISK	633
		1814,09	VVEAESEVPLAMAEALR	634
		2284,45	AAIDLAGRDVLEAVQMSVNPVK + Oxidation (M)	635
		2300,40	AGLALTTNQLESHYLAGGNVDR	636
		2807,80	TVLSKGLDSGTAFEILSIDIADVDISK	637

Designação do polipeptídeo	Peso molecular aproximado em kilodáltons (kDa) ¹	Valor m/z de fragmentos de polipeptídeo resultantes de digestão com tripsina ²	Sequência de aminoácido prevista do fragmento de polipeptídeo	SEQ ID NO:
P493	35	762,46	FVFHGR	638
		964,39	DGFNNIER	639
		1363,56	GHVYNGISGGQFK	640
		1443,56	YTPTSILYFNPK	641
		1450,64	QLAEDLQKHLGAK	642
		1819,88	NHSEYVTDMRLGIR + Oxidation (M)	643
		1875,84	DLPPMEQVFDLTDLDK	644
		1941,00	IRPEDMHIMANIFLPK + Oxidation (M)	645
		2081,10	RIRPEDMHIMANIFLPK	646
P495	32	2283,30	ISHLVLRTRTGLYIIDSQLLK	647

1. Peso molecular conforme determinado através de SDS-PAGE.

2. O valor m/z de um fragmento de polipeptídeo pode ser convertido em massa subtraindo 1 do valor m/z. Cada massa inclui uma faixa de mais ou menos 430 partes por milhão (ppm) ou 1 Dalton.

Neste contexto, "identidade de sequência" refere-se à identidade entre duas sequências de polinucleotídeo. Identidade de sequência é geralmente determinada pelo alinhamento das bases dos dois polinucleotídeos (por exemplo, alinhamento da sequência de nucleotídeo da sequência candidata e uma sequência de nucleotídeo que inclui, por exemplo, a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO:474 ou SEQ ID NO:485) para otimizar o número de nucleotídeos idênticos ao longo dos comprimentos de suas sequências; lacunas em uma ou ambas as sequências são permitidas na realização do alinhamento a fim de otimizar o número de nucleotídeos compartilhados, embora o nucleotídeo em cada sequência deva permanecer em sua ordem própria. Uma sequência candidata é a sequência sendo comparada com uma sequência conhecida – por exemplo, uma sequência de nucleotídeo que inclui a sequência de nucleotídeo da, por exemplo, SEQ ID NO:474 ou SEQ ID NO:485. Por exemplo, duas sequências de nucleotídeo podem ser comparadas usando o programa Blastn do algoritmo de pesquisa BLAST 2, conforme descrito por Tatiana e outros, *FEMS Microbiol Lett.*, 1999; 174: 247-250 e disponível na world wide web em ncbi.nlm.nih.gov/BLAST. Os valores *default* para todos os parâmetros de pesquisa BLAST 2 podem ser usados, incluindo recompensa para compatibilidade = 1, penalidade para falta de compatibilidade = -2, penalidade de lacuna aberta = 5, penalidade de lacuna de extensão = 2, lacuna x_dropoff = 50, esperado = 10, tamanho da palavra = 11 e filtrar.

Por exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode incluir um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo geralmente conhecido como formato acetiltransferase (PflB). Uma modalidade de tal polinucleotídeo é refletida na SEQ ID NO:430. Modalidades variantes são refletidas nas SEQ ID NO:431, SEQ ID NO:432, SEQ ID NO:433, SEQ ID NO:434, SEQ ID NO:435, SEQ ID NO:436, SEQ ID NO:437, SEQ ID NO:438, SEQ ID NO:439 e SEQ ID NO:440.

Como outro exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode incluir um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo geralmente conhecido como oligonucleotídeo permease, proteína de ligação de peptide (Opp1A).

Uma modalidade de tal polinucleotídeo é refletida na SEQ ID NO:441. Modalidades variantes são refletidas nas SEQ ID NO:442, SEQ ID NO:443, SEQ ID NO:444, SEQ ID NO:445, SEQ ID NO:446, SEQ ID NO:447, SEQ ID NO:448, SEQ ID NO:449, SEQ ID NO:450 e SEQ ID NO:451.

5 Como outro exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode incluir um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo geralmente conhecido como proteína de ligação a transportador ABC de composto sideróforo (SifrA). Uma modalidade de tal polinucleotídeo é refletida na SEQ ID NO:452. Modalidades variantes são refletidas nas SEQ ID NO:453, SEQ ID NO:454,
10 SEQ ID NO:455, SEQ ID NO:456, SEQ ID NO:457, SEQ ID NO:458, SEQ ID NO:459, SEQ ID NO:460, SEQ ID NO:461 e SEQ ID NO:462.

 Como outro exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode incluir um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo referido aqui como SYN2. Uma modalidade de tal polinucleotídeo é refletida na SEQ ID NO:463.
15 Modalidades variantes são refletidas nas SEQ ID NO:464, SEQ ID NO:465, SEQ ID NO:466, SEQ ID NO:467, SEQ ID NO:468, SEQ ID NO:469, SEQ ID NO:470, SEQ ID NO:471, SEQ ID NO:472 e SEQ ID NO:473.

 Como outro exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode incluir um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo geralmente conhecido
20 como FhuD. Uma modalidade de tal polinucleotídeo é refletida na SEQ ID NO:474. Modalidades variantes são refletidas nas SEQ ID NO:475, SEQ ID NO:476, SEQ ID NO:477, SEQ ID NO:478, SEQ ID NO:479, SEQ ID NO:480, SEQ ID NO:481, SEQ ID NO:482, SEQ ID NO:483e SEQ ID NO:484.

25 Como outro exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode incluir um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo referido aqui como SYN1. Uma modalidade de tal polinucleotídeo é refletida na SEQ ID NO:485. Modalidades variantes são refletidas nas SEQ ID NO:486, SEQ ID NO:487, SEQ ID NO:488, SEQ ID NO:489, SEQ ID NO:490, SEQ ID NO:491, SEQ ID
30 NO:492, SEQ ID NO:493, SEQ ID NO:494 e SEQ ID NO:495.

 Como outro exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode incluir um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo geralmente conhecido

como MntC. Uma modalidade de tal polinucleotídeo é refletida na SEQ ID NO:496. Uma modalidade de tal polinucleotídeo é refletida na SEQ ID NO:496. Modalidades variantes são refletidas nas SEQ ID NO:497, SEQ ID NO:498, SEQ ID NO:499, SEQ ID NO:500, SEQ ID NO:501, SEQ ID NO:502, SEQ ID NO:503, SEQ ID NO:504, SEQ ID NO:505 e SEQ ID NO:506.

Como outro exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode incluir um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo geralmente conhecido como lipoproteína transportadora ABC de ferricromo (SstD). Modalidades de tal polinucleotídeo são refletidas como SEQ ID NO:563, SEQ ID NO:564, SEQ ID NO:565, SEQ ID NO:566, SEQ ID NO:567, SEQ ID NO:568, SEQ ID NO:569, SEQ ID NO:570, SEQ ID NO:571 e SEQ ID NO:572.

Como outro exemplo, um polinucleotídeo da invenção pode incluir um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo geralmente conhecido como transportador ABC de composto de ferro (FhuD2). Modalidades de tal polinucleotídeo são refletidas nas SEQ ID NO:573, SEQ ID NO:574, SEQ ID NO:575, SEQ ID NO:576, SEQ ID NO:577, SEQ ID NO:578, SEQ ID NO:579, SEQ ID NO:580, SEQ ID NO:581 e SEQ ID NO:582.

São também providas pela presente invenção preparações de célula integral de um micróbio, onde o micróbio expressa um ou mais dos polipeptídeos da presente invenção. As células presentes em uma preparação de célula integral são preferivelmente inativadas de maneira que as células não possam replicar, mas a atividade imunológica dos polipeptídeos da presente invenção expressa pelo micróbio é mantida. Tipicamente, as células são mortas através de exposição a agentes tal como glutaraldeído, formalina ou formaldeído.

Composições

Uma composição da presente invenção pode incluir pelo menos um polipeptídeo isolado descrito aqui ou vários polipeptídeos que é um inteiro maior do que um (por exemplo, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro). Por exemplo, uma composição pode incluir um polipeptídeo isolado que inclui a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:408 e/ou um

polipeptídeo isolado que inclui a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:397. A menos que um nível específico de similaridade e/ou identidade de sequência seja expressamente identificado aqui (por exemplo, pelo menos 80% de similaridade de sequência, pelo menos 90% de identidade de sequência, etc), referência à sequência de aminoácido de uma SEQ ID NO. identificada inclui variantes tendo os níveis de similaridade de sequência e/ou os níveis de identidade de sequência descritos aqui na seção intitulada "*Similaridade de sequência de polipeptídeo e identidade de sequência de polipeptídeo*".

10 Em algumas modalidades, a composição pode incluir um ou mais polipeptídeos isolados adicionais. Em algumas modalidades, o polipeptídeo ou polipeptídeos isolados adicionais podem incluir um ou mais polipeptídeos regulados por metal. Desta maneira, uma composição pode incluir pelo menos um polipeptídeo regulado por metal isolado que inclui uma sequência de aminoácido mostrada em uma ou mais de SEQ ID NO:353 até SEQ ID NO:429 e/ou uma ou mais de SEQ ID NO:543 até SEQ ID NO:562. Adicionalmente ou alternativamente, uma composição pode incluir pelo menos um polipeptídeo regulado por metal isolado tendo um peso molecular de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa ou 33 kDa. Adicionalmente

15 ou alternativamente, uma composição pode incluir pelo menos um polipeptídeo isolado regulado por metal que inclui uma sequência de aminoácido codificada por um polinucleotídeo que inclui uma sequência de nucleotídeo mostrada em uma ou mais de SEQ ID NO:430 até a SEQ ID NO:506 e/ou uma ou mais de SEQ ID NO:563 até a SEQ ID NO:582.

25 Em uma modalidade, a composição inclui um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:397 (ou uma variante da mesma tal como, por exemplo, qualquer uma das sequências de aminoácido mostradas na SEQ ID NO:398, SEQ ID NO:399, SEQ ID NO:400, SEQ ID NO:401, SEQ ID NO:402, SEQ ID NO:403, SEQ ID NO:404, SEQ ID NO:405, SEQ ID NO:406 ou SEQ ID NO:407).

30 Em outro modalidade, a composição inclui um polipeptídeo que inclui uma sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:408 (ou uma

variante da mesma tal como, por exemplo, qualquer uma das sequências de aminoácido mostradas na SEQ ID NO:409, SEQ ID NO:410, SEQ ID NO:411, SEQ ID NO:412, SEQ ID NO:413, SEQ ID NO:414, SEQ ID NO:415, SEQ ID NO:416, SEQ ID NO:417 ou SEQ ID NO:418).

5 Em outra modalidade, a composição inclui um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:419 (ou uma variante da mesma tal como, por exemplo, qualquer uma das sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID NO:420, SEQ ID NO:421, SEQ ID NO:422, SEQ ID NO:423, SEQ ID NO:424, SEQ ID NO:425, SEQ ID
10 NO:426, SEQ ID NO:427, SEQ ID NO:428 ou SEQ ID NO:429).

 Em outra modalidade, a composição inclui um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:375 (ou uma variante da mesma, tal como, por exemplo, qualquer uma das sequências de aminoácido mostradas na SEQ ID NO:376, SEQ ID NO:377, SEQ ID
15 NO:378, SEQ ID NO:379, SEQ ID NO:380, SEQ ID NO:381, SEQ ID NO:382, SEQ ID NO:383, SEQ ID NO:384 ou SEQ ID NO:385).

 Em outra modalidade, a composição inclui um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:386 (ou uma variante da mesma tal como, por exemplo, qualquer uma das sequências de aminoácido mostradas na SEQ ID NO:387, SEQ ID NO:388, SEQ ID
20 NO:389, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:391, SEQ ID NO:392, SEQ ID NO:393, SEQ ID NO:394, SEQ ID NO:395 ou SEQ ID NO:396).

 Em outra modalidade, a composição inclui um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:364 (ou uma variante da mesma tal como, por exemplo, qualquer uma das sequências de aminoácido mostradas na SEQ ID NO:365, SEQ ID NO:366, SEQ ID
25 NO:367, SEQ ID NO:368, SEQ ID NO:369, SEQ ID NO:370, SEQ ID NO:371, SEQ ID NO:372, SEQ ID NO:373 ou SEQ ID NO:374).

 Em outra modalidade, a composição inclui um polipeptídeo que
30 inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:353 (ou uma variante da mesma tal como, por exemplo, qualquer uma das sequências de aminoácido mostradas na SEQ ID NO:354, SEQ ID NO:355, SEQ ID

NO:356, SEQ ID NO:357, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:360, SEQ ID NO:361, SEQ ID NO:362 ou SEQ ID NO:363).

Em outra modalidade, a composição inclui um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido, ou uma variante da mesma, de qualquer uma das sequências de aminoácido mostradas na SEQ ID NO:543, SEQ ID NO:544, SEQ ID NO:545, SEQ ID NO:546, SEQ ID NO:547, SEQ ID NO:548, SEQ ID NO:549, SEQ ID NO:550, SEQ ID NO:551 ou até SEQ ID NO:552.

Em outra modalidade, a composição inclui um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido, ou variante da mesma, de qualquer uma das sequências de aminoácido mostradas na SEQ ID NO:553, SEQ ID NO:554, SEQ ID NO:555, SEQ ID NO:556, SEQ ID NO:557, SEQ ID NO:558, SEQ ID NO:559, SEQ ID NO:560, SEQ ID NO:561 ou SEQ ID NO:562.

Em algumas modalidades, a composição pode incluir uma combinação de dois ou mais polipeptídeos selecionados do que segue: um polipeptídeo SNY, um polipeptídeo MntC, um polipeptídeo FhuD, um polipeptídeo SYN2, um polipeptídeo SirA, um polipeptídeo Opp1A e um polipeptídeo Pflb.

Desta maneira, a composição pode incluir pelo menos um ou uma combinação que inclui pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro, pelo menos cinco, pelo menos seis ou todos os sete de: um polipeptídeo SYN1, um polipeptídeo MntC, um polipeptídeo FhuD, um polipeptídeo SYN2, um polipeptídeo SirA, um polipeptídeo Opp1A e um polipeptídeo Pflb.

Composições exemplares que incluem combinações de polipeptídeos são identificadas na Tabela 6.

Composição	SYN1	MntC	FhuD	SYN2	SirA	Opp1A	Pflb
2 pPeptídeos*							
1	X	X					
2	X		X				
3	X			X			
4	X				X		
5	X					X	

<u>Composição</u>	<u>SYN1</u>	<u>MntC</u>	<u>FhuD</u>	<u>SYN2</u>	<u>SirA</u>	<u>Opp1A</u>	<u>Pflb</u>
6	X						X
7		X	X				
8		X		X			
9		X			X		
10		X				X	
11		X					X
12			X	X			
13			X		X		
14			X			X	
15			X				X
16				X	X		
17				X		X	
18				X			X
19					X	X	
20					X		X
21						X	X
3 pPeptídeos*							
22	X	X	X				
23	X	X		X			
24	X	X			X		
25	X	X				X	
26	X	X					X
27	X		X	X			
28	X		X		X		
29	X		X			X	
30	X		X				X
31	X			X	X		
32	X			X		X	
33	X			X			X
34	X				X	X	
35	X				X		X
36	X					X	X
37		X	X	X			
38		X	X		X		

<u>Composição</u>	<u>SYN1</u>	<u>MntC</u>	<u>FhuD</u>	<u>SYN2</u>	<u>SirA</u>	<u>Opp1A</u>	<u>Pflb</u>
39		X	X			X	
40		X	X				X
41		X		X	X		
42		X		X		X	
43		X		X			X
44		X			X	X	
45		X			X		X
46		X				X	X
47			X	X	X		
48			X	X		X	
49			X	X			X
50			X		X	X	
51			X		X		X
52			X			X	X
53				X	X	X	
54				X	X		X
55				X		X	X
56					X	X	X
4 pPeptideos*	X	X	X	X			
57	X	X	X		X		
58	X	X	X			X	
59	X	X	X				X
60	X	X		X	X		
61	X	X		X		X	
62	X	X		X			X
63	X	X			X		
64	X	X			X	X	
65	X	X			X		X
67	X	X				X	X
68	X		X	X	X		
69	X		X	X		X	
70	X		X	X			X
71	X		X		X	X	
72	X		X		X		X

<u>Composição</u>	<u>SYN1</u>	<u>MntC</u>	<u>FhuD</u>	<u>SYN2</u>	<u>SirA</u>	<u>Opp1A</u>	<u>Pflb</u>
73	X		X			X	X
74	X			X	X	X	
75	X			X	X		X
76	X				X	X	X
77		X	X	X	X		
78		X	X	X		X	
79		X	X	X			X
80		X	X		X	X	
81		X	X		X		X
82		X	X			X	X
83		X		X	X	X	
84		X		X	X		X
85		X		X		X	X
86		X			X	X	X
87			X	X	X	X	
88			X	X	X		X
89			X	X		X	X
90			X		X	X	X
91				X	X	X	X
5 pPeptídeos*							
92	X	X	X	X	X		
93	X	X	X	X		X	
94	X	X	X	X			X
95	X	X	X		X	X	
96	X	X	X		X		X
97	X	X	X			X	X
98	X	X		X	X	X	
99	X	X		X	X		X
100	X	X		X		X	X
101	X	X			X	X	X
102	X		X	X	X	X	
103	X		X	X	X		X
104	X		X	X		X	X
105	X		X		X	X	X

<u>Composição</u>	<u>SYN1</u>	<u>MntC</u>	<u>FhuD</u>	<u>SYN2</u>	<u>SirA</u>	<u>Opp1A</u>	<u>Pflb</u>
106	X			X	X	X	X
107		X	X	X	X	X	
108		X	X	X	X		X
109		X	X	X		X	X
110		X	X		X	X	X
111		X		X	X	X	X
112			X	X	X	X	X
6 pPeptídeos*							
113	X	X	X	X	X	X	
114	X	X	X	X	X		X
115	X	X	X	X		X	X
116	X	X	X		X	X	X
117	X	X		X	X	X	X
118	X		X	X	X	X	X
119		X	X	X	X	X	X

* pPeptídeos = polipeptídeos

"X" identifica polipeptídeos incluídos em uma composição particular.

Em todo o relatório, um polipeptídeo SYN1 pode ser caracterizado por uma ou mais do que segue: uma sequência de aminoácido que inclui a sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO:408, SEQ ID NO:409, SEQ ID NO:410, SEQ ID NO:411, SEQ ID NO:412, SEQ ID NO:413, SEQ ID NO:414, SEQ ID NO:415, SEQ ID NO:416, SEQ ID NO:417 ou SEQ ID NO:418, sendo codificada por um polinucleotídeo que inclui a sequência de ácido nucleico mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO:485, SEQ ID NO:486, SEQ ID NO:487, SEQ ID NO:488, SEQ ID NO:489, SEQ ID NO:490, SEQ ID NO:491, SEQ ID NO:492, SEQ ID NO:493, SEQ ID NO:494, SEQ ID NO:495, e/ou um peso molecular calculado de cerca de 33,1 kDa.

Em todo o relatório, um polipeptídeo MntC pode ser caracterizado por um ou mais do que segue: possuir um peso molecular conforme determinado através de SDS-PAGE de 33 kDa, uma impressão digital de massa de pelo menos 80% similar à impressão digital de massa de um polipeptídeo regulado por metal de 33 kDa produzido pela linhagem de referência S.

aureus isolato ATCC 19636, uma sequência de aminoácido que inclui a sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO:419, SEQ ID NO:420, SEQ ID NO:421, SEQ ID NO:422, SEQ ID NO:423, SEQ ID NO:424, SEQ ID NO:425, SEQ ID NO:426, SEQ ID NO:427, SEQ ID NO:428
5 ou SEQ ID NO:429, sendo codificado por um polinucleotídeo que inclui a sequência de ácido nucleico mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO:496, SEQ ID NO:497, SEQ ID NO:498, SEQ ID NO:499, SEQ ID NO:500, SEQ ID NO:501, SEQ ID NO:502, SEQ ID NO:503, SEQ ID NO:504, SEQ ID NO:505 ou SEQ ID NO:506, e/ou peso molecular calculado de cerca de 34,6 kDa.

10 Em todo o relatório, um polipeptídeo FhuD pode ser caracterizado por um ou mais do que segue: uma sequência de aminoácido que inclui a sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO:397, SEQ ID NO:398, SEQ ID NO:399, SEQ ID NO:400, SEQ ID NO:401, SEQ ID NO:402, SEQ ID NO:403, SEQ ID NO:404, SEQ ID NO:405, SEQ ID NO:406
15 ou SEQ ID NO:407, sendo codificado por um polinucleotídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO:474, SEQ ID NO:475, SEQ ID NO:476, SEQ ID NO:477, SEQ ID NO:478, SEQ ID NO:479, SEQ ID NO:480, SEQ ID NO:481, SEQ ID NO:482, SEQ ID NO:483 ou SEQ ID NO:484, e/ou peso molecular calculado de cerca de 35,4 kDa.

20 Em todo o relatório, um polipeptídeo SYN2 pode ser caracterizado por um ou mais do que segue: um peso molecular conforme determinado através de SDS-PAGE de 36 kDa, uma impressão digital de massa de pelo menos 80% similar à impressão digital de massa de um polipeptídeo regulado por metal de 36 kDa produzido pela linhagem de referência *S. aureus*
25 isolato ATCC 19636, uma sequência de aminoácido que inclui a sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO:386, SEQ ID NO:387, SEQ ID NO:388, SEQ ID NO:389, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:391, SEQ ID NO:392, SEQ ID NO:393, SEQ ID NO:394, SEQ ID NO:395 ou SEQ ID NO:396, sendo codificado por um polinucleotídeo que inclui a
30 sequência de ácido nucleico mostrada em qualquer uma da SEQ ID NO:463, SEQ ID NO:464, SEQ ID NO:465, SEQ ID NO:466, SEQ ID NO:467, SEQ ID NO:468, SEQ ID NO:469, SEQ ID NO:470, SEQ ID NO:471, SEQ ID NO:472

ou SEQ ID NO:473, e/ou peso molecular calculado de cerca de 36,5 kDa.

Em todo o relatório, um polipeptídeo SirA pode ser caracterizado por um ou mais do que segue: um peso molecular conforme determinado por SDS-PAGE de 37 kDa, uma impressão digital de massa de 80% similar à
5 impressão digital de massa de um polipeptídeo regulado por metal de 37 kDa produzido pela linhagem de referência *S. aureus* isolato ATCC 19636, uma sequência de aminoácido que inclui a sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO:375, SEQ ID NO:376, SEQ ID NO:377, SEQ ID NO:378, SEQ ID NO:379, SEQ ID NO:380, SEQ ID
10 NO:381, SEQ ID NO:382, SEQ ID NO:383, SEQ ID NO:384 ou SEQ ID NO:385, sendo codificado por um polinucleotídeo que inclui a sequência de ácido nucleico mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO:452, SEQ ID NO:453, SEQ ID NO:454, SEQ ID NO:455, SEQ ID NO:456, SEQ ID NO:457, SEQ ID NO:458, SEQ ID NO:459, SEQ ID NO:460, SEQ ID NO:461
15 ou SEQ ID NO:462, e/ou um peso molecular calculado de cerca de 36,6 kDa.

Em todo o relatório, um polipeptídeo Opp1A pode ser caracterizado por um ou mais do que segue: um peso molecular conforme determinado através de SDS-PAGE de 55 kDa, uma impressão digital de massa de
20 pelo menos 80% similar à impressão digital de massa de um polipeptídeo regulado por metal de 55 kDa produzido pela linhagem de referência *S. aureus* isolato ATCC 19636, uma sequência de aminoácido que inclui a sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:365, SEQ ID NO:366, SEQ ID NO:367, SEQ ID NO:368, SEQ ID
25 NO:369, SEQ ID NO:370, SEQ ID NO:371, SEQ ID NO:372, SEQ ID NO:373 ou SEQ ID NO:374, sendo codificado por um polinucleotídeo que inclui a sequência de ácido nucleico mostrada em qualquer uma da SEQ ID NO:441, SEQ ID NO:442, SEQ ID NO:443, SEQ ID NO:444, SEQ ID NO:445, SEQ ID NO:446, SEQ ID NO:447, SEQ ID NO:448, SEQ ID NO:449, SEQ ID NO:450
30 ou SEQ ID NO:451, e/ou um peso molecular calculado de cerca de 59,9 kDa.

Em todo o relatório, um polipeptídeo PflB pode ser caracterizado

por um ou mais do que segue: um peso molecular conforme determinado através de SDS-PAGE de 88 kDa, uma impressão digital de massa de 80% similar à impressão digital de massa de um polipeptídeo regulado por metal de 88 kDa produzido pela linhagem de referência *S. aureus* isolato ATCC 5 19636, uma sequência de aminoácido que inclui a sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO:353, SEQ ID NO:354, SEQ ID NO:355, SEQ ID NO:356, SEQ ID NO:357, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:360, SEQ ID NO:361, SEQ ID NO:362 ou SEQ ID NO:363, sendo codificado por um polinucleotídeo que inclui a sequência de 10 ácido nucleico mostrada em qualquer uma de SEQ ID NO:430, SEQ ID NO:431, SEQ ID NO:432, SEQ ID NO:433, SEQ ID NO:434, SEQ ID NO:435, SEQ ID NO:436, SEQ ID NO:437, SEQ ID NO:438, SEQ ID NO:439 ou SEQ ID NO:440, e/ou um peso molecular calculado de cerca de 84,7 kDa.

15 Em outra modalidade particular, a composição pode incluir uma combinação de polipeptídeos tais como, por exemplo, um polipeptídeo MntC, um polipeptídeo FhuD, um polipeptídeo SirA e um polipeptídeo SYN2 (Composição 77 da Tabela 6), cada polipeptídeo sendo caracterizado conforme descrito imediatamente acima.

20 Em algumas modalidades, uma composição pode incluir um ou mais polipeptídeos que são produzidos recombinantemente. Por exemplo, uma composição pode incluir um polipeptídeo Pflb recombinantemente produzido tal como, por exemplo, um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:353, embora um polipeptídeo Pflb re- 25 combinantemente produzido possa ser caracterizado de qualquer maneira onde um polipeptídeo Pflb pode ser caracterizado, conforme descrito acima, em adição a ser recombinantemente produzido. Tal composição pode incluir um ou mais polipeptídeos recombinantemente produzidos, um ou mais polipeptídeos isolados de *S. aureus* ou qualquer combinação dos mesmos.

30 Como outro exemplo, uma composição pode incluir um polipeptídeo Opp1A recombinantemente produzido tal como, por exemplo, um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID

NO:364, embora um polipeptídeo Opp1A recombinantemente produzido possa ser caracterizado de qualquer maneira onde um polipeptídeo Opp1A pode ser caracterizado, conforme descrito acima, em adição a ser recombinantemente produzido. Tal composição pode incluir ainda um ou mais polipeptídeos recombinantemente produzidos, um ou mais polipeptídeos isolados de *S. aureus* ou qualquer combinação dos mesmos.

Como outro exemplo, uma composição pode incluir um polipeptídeo SirA recombinantemente produzido tal como, por exemplo, um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:375, embora um polipeptídeo SirA recombinantemente produzido possa ser caracterizado de qualquer maneira onde um polipeptídeo SirA pode ser caracterizado, conforme descrito acima, em adição a ser recombinantemente produzido. Tal composição pode incluir ainda um ou mais polipeptídeos recombinantemente produzidos, um ou mais polipeptídeos isolados de *S. aureus* ou qualquer combinação dos mesmos.

Como outro exemplo, uma composição pode incluir um polipeptídeo SYN2 recombinantemente produzido tal como, por exemplo, um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:386, embora um polipeptídeo SYN2 recombinantemente produzido possa ser caracterizado de qualquer maneira onde um polipeptídeo SYN2 pode ser caracterizado, conforme descrito acima, em adição a ser recombinantemente produzido. Tal composição pode incluir ainda um ou mais polipeptídeos recombinantemente produzidos, um ou mais polipeptídeos isolados de *S. aureus* ou qualquer combinação dos mesmos.

Como outro exemplo, uma composição pode incluir um polipeptídeo FhuD recombinantemente produzido tal como, por exemplo, um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:397, embora um polipeptídeo FhuD recombinantemente produzido possa ser caracterizado de qualquer maneira onde um polipeptídeo FhuD pode ser caracterizado, conforme descrito acima, em adição a ser recombinantemente produzido. Tal composição pode incluir ainda um ou mais polipeptídeos recombinantemente produzidos, um ou mais polipeptídeos isolados de *S. au-*

reus ou qualquer combinação dos mesmos.

Como outro exemplo, uma composição pode incluir um polipeptídeo SYN1 recombinantemente produzido tal como, por exemplo, um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:408, embora um polipeptídeo SYN1 recombinantemente produzido possa ser caracterizado de qualquer maneira onde um polipeptídeo SYN1 pode ser caracterizado, conforme descrito acima, em adição a ser recombinantemente produzido. Tal composição pode incluir ainda um ou mais polipeptídeos recombinantemente produzidos, um ou mais polipeptídeos isolados de *S. aureus* ou qualquer combinação dos mesmos.

Como outro exemplo, uma composição pode incluir um polipeptídeo MntC recombinantemente produzido tal como, por exemplo, um polipeptídeo que inclui a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO:419, embora um polipeptídeo MntC recombinantemente produzido possa ser caracterizado de qualquer maneira onde um polipeptídeo MntC pode ser caracterizado, conforme descrito acima, em adição a ser recombinantemente produzido. Tal composição pode incluir ainda um ou mais polipeptídeos recombinantemente produzidos, um ou mais polipeptídeos isolados de *S. aureus* ou qualquer combinação dos mesmos.

Em algumas modalidades, um polipeptídeo recombinantemente produzido pode representar um fragmento imunologicamente ativo da versão nativa do polipeptídeo. Um fragmento imunologicamente ativo pode incluir adições de aminoácido ao terminal amino e/ou terminal carbóxi do núcleo (por exemplo, a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 353, SEQ ID NO: 364, SEQ ID NO: 375, SEQ ID NO: 386, SEQ ID NO: 397, SEQ ID NO: 408 ou SEQ ID NO: 419) do fragmento imunologicamente ativo. Em certas modalidades, qualquer adição ao terminal amino do núcleo do fragmento imunologicamente ativo pode incluir uma ou mais adições, deleções, substituições de aminoácido (coletivamente "modificações") ou qualquer combinação de modificação comparado com versão mais longa – por exemplo, tipo selvagem ou outra forma nativa – do polipeptídeo. Desta maneira, por exemplo, em modalidades onde o fragmento imunologicamente ativo inclui SEQ ID

NO:397, uma adição ao terminal amino da SEQ ID NO:397 pode incluir pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 11, pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15,
5 pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20, pelo menos 21, pelo menos 22, pelo menos 23, pelo menos 24, pelo menos 25 ou pelo menos 26 modificações na adição do terminal amino, por exemplo, aminoácidos 1-26 da SEQ ID NO:399. Como outro exemplo, em modalidades onde o fragmento imunologicamente ativo inclui SEQ ID
10 NO:408, uma adição ao terminal amino da SEQ ID NO:408 pode incluir pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4 ou pelo menos 5 modificações na adição do terminal amino comparado com, por exemplo, os aminoácidos 1-26 da SEQ ID NO:415.

Quando comparando a similaridade de sequência de aminoácido
15 e/ou identidade de sequência de aminoácido de um polipeptídeo de referência e um polipeptídeo candidato de um comprimento diferente (por exemplo um fragmento imunologicamente ativo do polipeptídeo de referência) a similaridade e/ou identidade pode ser computada em um comprimento integral do polipeptídeo mais longo, contando cada resíduo de aminoácido de comprimento maior no polipeptídeo mais longo contribuindo como uma divergência.
20

Em algumas modalidades, desta maneira, um polipeptídeo isolado da invenção pode incluir um polipeptídeo tendo pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de similaridade e/ou identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 397, contanto que se o polipeptídeo isolado incluir um ou mais aminoácidos adicionais no terminal amino, o um ou mais aminoácidos adicionais incluem pelo menos uma deleção de aminoácido ou pelo menos uma substituição de
25 aminoácido comparado com os aminoácidos 1-26 da SEQ ID NO:399.
30

Em outras modalidades, um polipeptídeo isolado da invenção pode incluir um polipeptídeo tendo pelo menos 98% ou pelo menos 99% de

similaridade e/ou identidade de sequência com a sequência de aminoácido a SEQ ID NO:408, contanto que se o polipeptídeo isolado incluir um ou mais aminoácidos adicionais no terminal amino, o um ou mais aminoácidos adicionais incluem pelo menos uma deleção de aminoácido ou pelo menos uma substituição de aminoácido comparado com os aminoácidos 1-5 da SEQ ID NO:415.

Conforme acima mencionado na seção intitulada *Similaridade de sequência de polipeptídeo e identidade de sequência de polipeptídeo*, um polipeptídeo identificado pela referência à sequência de aminoácido de uma SEQ ID NO: particular pode incluir um polipeptídeo com pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido (por exemplo, a sequência de aminoácido provida em uma SEQ ID NO.) e/ou um polipeptídeo com pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 86%, pelo menos 87%, pelo menos 88%, pelo menos 89%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de referência (por exemplo, a sequência de aminoácido provida em uma SEQ ID NO. especificada).

Um polipeptídeo recombinantemente produzido pode ser expresso a partir de um vetor que permite expressão do polipeptídeo quando o vetor é introduzido em uma célula hospedeiro apropriada. Uma célula hospedeiro pode ser construída para produzir um ou mais polipeptídeos recombinantemente produzidos da invenção e, então, pode incluir um ou mais vetores que incluem pelo menos um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da invenção. Desta maneira, cada vetor pode incluir um ou mais polinu-

cleotídeos da invenção – isto é, um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da invenção.

Certas composições tais como, por exemplo, aquelas incluindo polipeptídeos recombinantemente produzidos, podem incluir um número máximo de polipeptídeos. Em algumas modalidades, o número máximo de polipeptídeos pode referir-se ao número total máximo de polipeptídeos. Certas composições podem incluir, por exemplo, não mais do que 50 polipeptídeos tais como, por exemplo, não mais do que 40 polipeptídeos, não mais do que 30 polipeptídeos, não mais do que 25 polipeptídeos, não mais do que 20 polipeptídeos, não mais do que 15 polipeptídeos, não mais do que 10 polipeptídeos, não mais do que oito polipeptídeos, não mais do que sete polipeptídeos, não mais do que seis polipeptídeos, não mais do que cinco polipeptídeos, não mais do que quatro polipeptídeos, não mais do que três polipeptídeos, não mais do que dois polipeptídeos ou não mais do que um polipeptídeo. Em outras modalidades, um número máximo de polipeptídeos recombinantemente produzidos pode ser especificado de uma maneira similar. Em ainda outras modalidades, um número máximo de polipeptídeos não-recombinantemente produzidos pode ser especificado de uma maneira similar.

Uma composição pode incluir polipeptídeos isoláveis de um micróbio ou podem ser isoláveis de uma combinação de dois ou mais micróbios. Por exemplo, uma composição pode incluir polipeptídeos isoláveis de duas ou mais *Staphylococcus spp.* ou de uma *Staphylococcus spp.* e um micróbio diferente que não é um membro do gênero *Staphylococcus*. A presente invenção também provê composições incluindo uma preparação de célula integral, onde a célula integral expressa um ou mais dos polipeptídeos da presente invenção. Por exemplo, a célula integral pode ser uma *Staphylococcus spp.* Em alguns aspectos, uma composição pode incluir preparações integrais de duas, três, quatro, cinco ou seis linhagens.

Opcionalmente, um polipeptídeo da presente invenção pode ser covalentemente ligado ou conjugado a um polipeptídeo veículo para melhorar as propriedades imunológicas do polipeptídeo. Polipeptídeos carreadores

úteis são conhecidos na técnica. O acoplamento químico dos polipeptídeos da presente invenção pode ser realizado usando métodos conhecidos e de rotina. Por exemplo, vários reagentes de reticulação homobifuncionais e/ou heterobifuncionais tais como bis(sulfossuccinimidil)suberato, 5 bis(diazobenzidina), adipimidato de dimetila, pimelimidato de dimetila, supe- rimidato de dimetila, suberato de dissuccinimidila, glutaraldeído, m- maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida, sulfo-m-maleimidobenzoil-N- hidroxissuccinimida, 4-(N-maleimidometil)cicloexano-1-carboxilato de sulfos- succinimidila, 4-(p-maleimido-fenil)butirato de sulfossuccinimidila e (1-etil-3- 10 (dimetil-aminopropil)carbodiimida podem ser usados (vide, por exemplo, Har- low e Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, em geral e Capítulo 5, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nova York, NY (1988)).

As composições da presente invenção incluem opcionalmente ainda um veículo farmacologicamente aceitável. "Farmacologicamente aceitá- 15 vel" refere-se a um diluente, veículo, excipiente, sal, etc, que é compatível com os outros ingredientes da composição e não prejudiciais ao seu recipi- ente. Tipicamente, a composição inclui um veículo farmacologicamente acei- tável quando a composição é usada conforme aqui descrito. As composições da presente invenção podem ser formuladas em preparações farmacêuticas 20 em uma variedade de formas adaptadas para a via de administração esco- lhida, incluindo vias adequadas para estimulação de uma resposta imune a um antígeno. Desta maneira, uma composição da presente invenção pode ser administrada através de vias conhecidas incluindo, por exemplo, oral; parenteral, incluindo intradérmica, transcutânea e subcutânea; intramuscular, 25 intravenosa, intraperitoneal, etc, e topicamente tal como intranasal, intrapul- monar, intramamária, intravaginal, intrauterina, intradérmica, transcutânea e retalmente, etc. É previsto que uma composição pode ser administrada a uma superfície mucosa, tal como através da administração à mucosa nasal ou respiratória (por exemplo, através de um *spray* ou aerossol), a fim de 30 estimular imunidade mucosa, tal como produção de anticorpos IgA secretores, no corpo do animal.

Uma composição da presente invenção pode ser também admi-

nistrada através de um implante de liberação sustentada ou retardada. Implantes adequados para uso de acordo com a invenção são conhecidos e incluem, por exemplo, aqueles revelados em Emery e Straub (WO 01/37810 (2001)) e Emery e outros (WO 96/01620 (1996)). Implantes podem ser produzidos em tamanhos pequenos o suficiente para serem administrados através de aerossol ou *spray*. Implantes podem também incluir nanoesferas e microesferas .

Uma composição da presente invenção pode ser administrada em uma quantidade suficiente para tratar certas condições conforme aqui descrito. A quantidade de polipeptídeos ou células integrais presentes em uma composição da presente invenção pode variar. Por exemplo, a dosagem de polipeptídeos pode estar entre 0,01 microgramas (μg) e 300 mg, tipicamente entre 0,1 mg e 10 mg. Quando a composição é uma preparação de célula integral, as células podem estar presentes em uma concentração de, por exemplo, 10^2 bactérias/ml, 10^3 bactérias/ml, 10^4 bactérias/ml, 10^5 bactérias/ml, 10^6 bactérias/ml, 10^7 bactérias/ml, 10^8 bactérias/ml ou 10^9 bactérias/ml. Para uma composição injetável (por exemplo, subcutânea, intramuscular, etc) os polipeptídeos podem estar presentes na composição em quantidades de maneira que o volume total da composição administrada seja 0,5 ml a 5,0 ml, tipicamente 1,0 a 2,0 ml. Quando a composição é uma preparação de célula integral, as células estão preferivelmente presentes na composição em uma quantidade que o volume total da composição administrada é de 0,5 ml a 5,0 ml, tipicamente 1,0 a 2,0 ml. A quantidade administrada vai variar dependendo de vários fatores incluindo, mas não limitado a, os polipeptídeos específicos escolhidos, o peso, condição física e idade do animal e a via de administração. Desta maneira, o peso absoluto do polipeptídeo incluído em uma dada forma de dosagem unitária pode variar amplamente e depende de fatores tais como a espécie, idade, peso e condição física do animal, bem como o método de administração. Tais fatores podem ser determinados por um versado comum na técnica. Outros exemplos de dosagens adequadas para a invenção são revelados em Emery e outros (Patente U.S. 6.027.736).

As formulações podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas através de métodos bem conhecidos na técnica de Farmácia. Métodos de preparação de uma composição com um veículo farmacologicamente aceitável incluem a etapa

5 de trazer o composto ativo (por exemplo, um polipeptídeo ou célula integral da presente invenção) em associação com um veículo que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as formulações são preparadas trazendo em associação uniformemente e intimamente o composto ativo com um veículo líquido, um veículo sólido finamente dividido, ou ambos, e então,

10 se necessário, moldagem do produto nas formulações desejadas.

Uma composição incluindo um veículo farmacologicamente aceitável pode também incluir um adjuvante. Um adjuvante refere-se a um agente que pode agir de uma maneira não-específica para aumentar uma resposta imune a um antígeno particular, então reduzindo potencialmente a quantidade de antígeno necessária em qualquer dada composição de imunização

15 e/ou a frequência de injeção necessária a fim de gerar uma resposta imune adequada ao antígeno de interesse. Adjuvantes podem incluir, por exemplo, IL-1, IL-2, emulsificantes, dipeptídeos muramila, brometo de dimetil dioctadecil amônio (DDA), aviridina, hidróxido de alumínio, óleos, saponinas, alfa-tocoferol, polissacarídeos, parafinas emulsificadas (incluindo, por exemplo,

20 aquelas disponíveis sob a marca registrada EMULSIGEN da MVP Laboratories, Ralston, Nebraska), ISA-70, RIBI e outras substâncias conhecidas na técnica. É esperado que os polipeptídeos da invenção tenham atividade imunorreguladora e que tais polipeptídeos possam ser usados como adjuvantes que agem diretamente como ativadores de célula T e/ou B ou agem em

25 tipos específicos que aumentam a síntese de várias citocinas ou ativam cursos de sinalização intracelular. Tais polipeptídeos são esperados aumentar a resposta imune para aumentar o índice de proteção da composição existente.

30 Em outra modalidade, uma composição da invenção incluindo um veículo farmacologicamente aceitável pode incluir um modificador de resposta biológica e outras citocinas que afetam as células imunes. Uma com-

posição de imunização pode também incluir outros componentes conhecidos na técnica tais como um antibiótico, um preservativo, um antioxidante ou um agente de quelação.

Métodos de Fabricação

5 A presente invenção também provê métodos para obtenção de polipeptídeos descritos aqui. Os polipeptídeos e as células integrais da presente invenção podem ser isoláveis de um membro da família *Micrococca-*
10 *ceae*, preferivelmente *Staphylococcus spp.*, mais preferivelmente *Staphylo-*
 coccus aureus. Outros micróbios gram-positivos a partir dos quais polipeptí-
 deos podem ser isolados incluem *Corynebacterium spp.*, *Erysipelothrix spp.*,
 Mycobacterium spp. e *Erysipelothrix spp.* Micróbios úteis para obtenção dos
 polipeptídeos da presente invenção e fabricação de preparações de célula
 integral estão comercialmente disponíveis de um depósito tal como a *A-*
 merican Type Culture Collection (ATCC). Ainda, tais micróbios são pronta-
15 mente disponíveis através de técnicas de rotina e conhecidos na técnica. Os
 micróbios podem ser derivados de um animal infectado como um isolato de
 campo e usados para obter polipeptídeos e/ou preparações de célula inte-
 gral da presente invenção, ou armazenados para uso futuro, por exemplo,
 em um repositório congelado a -20°C até 95°C , ou -40°C a -50°C , em
20 meios bacteriológicos contendo 20% glicerol, e outros meios conhecidos.

 Quando um polipeptídeo da presente invenção tiver que se obti-
 do a partir de um micróbio, o micróbio pode ser incluído sob condições de
 baixo teor de metal. Conforme aqui usado, a expressão "condições de baixo
 teor de metal" refere-se a um ambiente, tipicamente meios bacteriológicos,
25 que contém quantidades de metal livre que fazem com que um micróbio ex-
 presse polipeptídeos regulados por metal em um nível detectável. Conforme
 aqui usado, a expressão "condições com alto teor de metal" refere-se a um
 ambiente que contém quantidades de metal livre que fazem com que um
 micróbio ou não expresse um ou mais polipeptídeos regulados por metal
30 descritos aqui em um nível detectável ou expresse tal polipeptídeo em um
 nível menor comparado com expressão do polipeptídeo regulado por metal
 sob condições com baixo teor de metal. Em alguns casos, "condições com

alto teor de metal" podem incluir um ambiente natural rico em metal e/ou cultura em um meio rico em metal sem um quelante de metal. Em contraste, em alguns casos, "condições com baixo teor de metal" podem incluir cultura em um meio que inclui um quelante de metal, conforme descrito em mais detalhes abaixo. Metais são aqueles presentes na Tabela Periódica sob os Grupos 1 a 17 (notação IUPAC; também referidos como Grupos I-A, II-A, III-B, IV-B, V-B, VI-B, VII-B, VIII, I-B, II-B, III-A, IV-A, V-A, VI-A e VII-A, respectivamente, sob a notação CAS). Preferivelmente, os metais são aqueles nos Grupos 2 a 12, mais preferivelmente Grupos 3-12. Mais preferivelmente ainda, o metal é ferro, cobre, magnésio, níquel, cobalto, manganês, molibdênio ou selênio, mais preferivelmente ferro.

Condições com baixo teor de metal são geralmente o resultado da adição de um composto quelante de metal a um meio bacteriológico, o uso de um meio bacteriológico que contém quantidades baixas de um metal ou a combinação dos mesmos. Condições com alto teor de metal estão geralmente expressas quando um quelante não está presente no meio, um metal é adicionado ao meio ou a combinação dos mesmos. Exemplos de quelantes de metal incluem compostos naturais e sintéticos. Exemplos de compostos naturais incluem compostos fenólicos de planta, tais como flavonoides. Exemplos de flavonoides incluem os quelantes de cobre catequina e naringenina, e os quelantes de ferro miricetina e quercetina. Exemplos de quelantes de cobre sintéticos incluem, por exemplo, tetratiomolibdato e exemplos de quelantes de zinco sintéticos incluem, por exemplo, N,N,N',N'-Tetrakis(2-piridilmetil)etileno diamina. Exemplos de quelantes de ferro sintéticos incluem 2,2'-dipiridila (também referido na técnica como α,α' -bipiridila), 8-hidroxiquinolina, ácido etilenodiamino-di-O-hidroxifenilacético (EDDHA), desferrioxamina metanossulfonato (desferol), transferrina, lactoferrina, ovotransferrina, sideróforos biológicos, tais como catecolatos e hidroxamatos, e citrato. Um exemplo de um quelante de cátion divalente geral é resina CHELEX. Preferivelmente, 2,2'-dipiridila é usada para a quelação de ferro. Tipicamente, 2,2'-dipiridila é adicionada ao meio em uma concentração de pelo menos 300 microgramas/mililitro ($\mu\text{g/ml}$), pelo menos 600 $\mu\text{g/ml}$ ou pelo me-

nos 900 µg/m. Níveis altos de 2,2'-dipiridinila podem ser 1200 µg/ml, 1500 µg/ml ou 1800 µg/ml.

O genoma de *S. aureus* codifica três homólogos Fur: Fur, PerR e Zur. Embora as proteínas Zur e PerR pareçam estar principalmente envolvidas na regulação de homeostase de zinco e genes de estresse de peróxido, respectivamente, a proteína Fur foi demonstrada regular vários sistemas de absorção sideróforo-ferro em resposta à limitação de ferro. A proteína Fur também desempenha um papel em resistência a estresse oxidativo e virulência. É esperado que um organismo gram-positivo, preferivelmente uma *S. aureus*, com uma mutação em um gene *fur* vá resultar na expressão constitutiva de muitos, se não todos, os polipeptídeos regulados por metal da presente invenção. A produção de uma mutação *fur* em uma *S. aureus*, preferivelmente gram-positiva, pode ser realizada usando métodos de rotina incluindo, por exemplo, mutagênese por transposon, química ou direcionada a sítio útil para geração de mutações de inativação de gene em bactérias gram-positivas.

O meio usado para incubar o micróbio e o volume de meio usado para incubar o micróbio podem variar. Quando um micróbio está sendo avaliado quanto à habilidade em produzir um ou mais dos polipeptídeos descritos aqui, o micróbio pode ser cultivado em um volume adequado, por exemplo, 10 mililitros a 1 litro de meio. Quando um micróbio está sendo cultivado para obter polipeptídeos para uso em, por exemplo, administração a animais, o micróbio pode ser cultivado em um fermentador para permitir o isolamento de quantidades maiores de polipeptídeos. Métodos para cultivo de micróbios em um fermentador são rotina e conhecidos na técnica. As condições usadas para cultivo de um micróbio preferivelmente incluem um quelante de metal, mais preferivelmente um quelante de ferro, por exemplo, 2,2'-dipiridila, um pH entre 6,5 e 7,5, preferivelmente entre 6,9 e 7,1 e uma temperatura de 37° C.

Em alguns aspectos da invenção, um micróbio pode ser coletado após cultivo. A coleta inclui concentração do micróbio em um volume menor e suspensão em um meio diferente do meio de crescimento. Métodos para

concentração de um micróbio são rotina e conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, filtragem e concentração. Tipicamente, o micróbio concentrado é suspenso em um tampão apropriado. Um exemplo de um tampão que pode ser usado contém base Tris (7,3 gramas/litro) em um pH de 8,5. Opcionalmente, o tampão final também minimiza degradação proteolítica. Isto pode ser realizado ao ter o tampão final em um pH maior do que 8,0, preferivelmente pelo menos 8,5 e/ou incluindo um ou mais inibidores de proteinase (por exemplo, fluoreto de fenilmetanossulfonila). Opcionalmente e preferivelmente o micróbio concentrado é congelado a -20° C ou abaixo até romper.

Quando o micróbio tiver que ser usado como uma preparação de célula integral, as células coletadas podem ser processadas usando métodos de rotina e conhecidos para inativar as células. Alternativamente, quando um micróbio tiver que ser usado para preparar polipeptídeos da presente invenção, o micróbio pode ser rompido usando métodos químicos, físicos ou mecânicos rotina e conhecidos na técnica incluindo, por exemplo, fervura, prensa francesa, sonificação, digestão de peptidoglicano (por exemplo, através de digestão com lisozima) ou homogeneização. Um exemplo de um dispositivo adequado útil para homogeneização é um homogeneizador AVES-

TIN modelo C500-B, (Avestin Inc., Ottawa, Canadá). Conforme aqui usado, "rompimento" refere-se à quebra da célula. Rompimento de um micróbio pode ser medido através de métodos que são rotina e conhecidos da técnica incluindo, por exemplo, mudanças em densidade óptica. Tipicamente, um micróbio é submetido a rompimento até a transmitância percentual ser aumentada em 20% quando uma diluição 1:100 é medida. Quando métodos físicos ou químicos são usados, a temperatura durante rompimento é tipicamente mantida baixa, preferivelmente a 4° C, para minimizar mais a degradação proteolítica. Quando métodos químicos são usados a temperatura pode ser aumentada para otimizar o rompimento celular. Uma combinação de métodos químicos, físicos e mecânicos pode ser também usada para solubilizar a parede celular do micróbio. Conforme aqui usado, o termo "solubilizar" refere-se à dissolução de materiais celulares (por exemplo, polipeptí-

deos, ácidos nucleicos, carboidratos) na fase aquosa do tampão onde o micróbio foi rompido e a formação de agregados de materiais celulares insolúveis. Sem pretender ser limitado pela teoria, as condições para solubilização são acreditadas resultar na agregação de polipeptídeos da presente invenção em agregados solúveis que são grandes o suficiente para permitir isolamento fácil através de, por exemplo, centrifugação.

Os agregados insolúveis que incluem um ou mais dos polipeptídeos da presente invenção podem ser isolados através de métodos que são rotina e conhecidos na técnica. Preferivelmente, os agregados insolúveis são isolados através de centrifugação. Tipicamente, centrifugação de polipeptídeos, tais como polipeptídeos de membrana, pode ser realizada por forças centrífugas de 100.000 x g. O uso de tais forças centrífugas requer o uso de ultracentrífuga e aumento para volumes de processo grandes de amostra é frequentemente difícil e não econômico com esses tipos de centrífuga. Os métodos descritos aqui proveem a produção de agregados insolúveis grandes o suficiente para permitir o uso de centrífugas de fluxo contínuo, por exemplo, T-1 Sharples (Alfa Laval Separations, Warminster, PA), que pode ser usada com uma taxa de fluxo de 250 ml/min a 117,210 Kpa (17 psi) em uma força centrífuga de 46.000 x g a 60.000 x g. Outras centrífugas de grande escala podem ser usadas, tais como configurações de tigela, câmara e disco tubulares. Tais centrífugas são rotineiramente usadas e conhecidas na técnica e estão comercialmente disponíveis de fabricantes tais como Pennwalt, Westfalia e alpha-Laval.

As proteínas coletadas finais são lavadas e/ou dialisadas contra um tampão apropriado usando métodos conhecidos na técnica, por exemplo, diafiltração, precipitação, cromatografia hidrofóbica, cromatografia de troca de íon ou cromatografia por afinidade, ou ultrafiltração e lavagem dos polipeptídeos, por exemplo, em álcool, através de diafiltração. Após isolamento, os polipeptídeos são suspensos em tampão e armazenados em temperatura baixa, por exemplo, -20° C ou abaixo.

Naqueles aspectos da presente invenção onde uma preparação de célula integral deve ser feita, após crescimento um micróbio pode ser

morto com a adição de um agente tal como glutaraldeído, formalina ou formaldeído em uma concentração suficiente para inativar as células na cultura. Por exemplo, formalina pode ser adicionada em uma concentração de 0,3% (vol:vol). Após um período de tempo suficiente para inativar as células, as

5 células podem ser coletadas através de, por exemplo, diafiltração e/ou centrifugação e lavadas.

Em outros aspectos, um polipeptídeo isolado da invenção pode ser preparado recombinantemente. Quando preparado recombinantemente, um polinucleotídeo codificando o polipeptídeo pode ser identificado e clonado em um hospedeiro de expressão apropriado conforme descrito abaixo no

10 Exemplo 14. O hospedeiro de expressão recombinante pode ser cultivado em um meio apropriado, rompido e os polipeptídeos isolados conforme acima descrito.

Métodos de Uso

15 Um aspecto da presente invenção refere-se ainda a métodos de uso das composições da presente invenção. Os métodos incluem administração a um animal de uma quantidade eficaz de uma composição da presente invenção. O animal pode ser, por exemplo, ave (incluindo, por exemplo, galinhas ou perus), bovino (incluindo, por exemplo, gado), caprino (incluindo, por exemplo, cabras), ovino (incluindo, por exemplo, ovelha), porco

20 (incluindo, por exemplo, suíno), bison (incluindo, por exemplo, búfalo), equino (incluindo, por exemplo, cavalos), um animal de companhia (incluindo, por exemplo, cachorros ou gatos), membros da família *Cervidae* (incluindo, por exemplo, cervo, alce, veado, alce caribou e rena) ou ser humano.

25 Em alguns aspectos, os métodos podem incluir ainda administrações adicionais (por exemplo, uma ou mais administrações de reforço) da composição ao animal para aumentar ou estimular uma resposta imune secundária. Um reforço pode ser administrado em um momento após a primeira administração, por exemplo, uma a oito semanas, preferivelmente duas a

30 quatro semanas, após a administração da composição. Reforços subsequentes podem ser administrados uma, duas, três, quatro ou mais vezes anualmente. Sem ser limitado pela teoria, é esperado que em alguns aspectos

tos da presente invenção reforços anuais não sejam necessários, como um animal será provocado no campo por exposição a micróbios expressando polipeptídeos presentes nas composições tendo epítomos que são idênticos a ou estruturalmente relacionados a epítomos presentes nos polipeptídeos da
5 composição administrada ao animal.

Em um aspecto, a invenção refere-se a métodos para fabricação de anticorpos, por exemplo, através da indução da produção de anticorpo em um animal ou através de técnicas recombinantes. O anticorpo produzido inclui anticorpo que se liga especificamente a pelo menos um polipeptídeo
10 presente na composição. Neste aspecto da invenção, uma "quantidade eficaz" é uma quantidade eficaz para resultar na produção de anticorpo no animal. Métodos para determinação de se um animal produziu anticorpos que se ligam especificamente a polipeptídeos presentes em uma composição da presente invenção podem ser determinados conforme descrito aqui. A pre-
15 sente invenção inclui ainda anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo da presente invenção e composições incluindo tais anticorpos.

O método pode ser usado para produzir anticorpo que se liga especificamente a polipeptídeos expressos por um micróbio outro que não o micróbio a partir do qual os polipeptídeos da composição foram isolados.
20 Conforme aqui usado, um anticorpo que pode "se ligar especificamente" a um polipeptídeo é um anticorpo que interage com o epítomo do antígeno que induziu a síntese do anticorpo ou interage com um epítomo estruturalmente relacionado. Pelo menos alguns dos polipeptídeos presentes nas composições da presente invenção tipicamente incluem epítomos que são conserva-
25 dos nos polipeptídeos de espécies diferentes e gêneros diferentes de micróbios. Desta maneira, anticorpo produzido usando uma composição derivada de um micróbio é esperado se ligar a polipeptídeos expressos por outros micróbios e provê proteção de amplo espectro contra organismos gram-positivos. Exemplos de micróbios gram-positivos aos quais o anticorpo pode
30 se ligar especificamente são *Micrococcaceae*, preferivelmente, *Staphylococcus spp.*, mais preferivelmente, *Staphylococcus aureus*; membros da família *Streptococcaceae*, preferivelmente, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus*

pneumoniae, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi*, ou *Streptococcus dysgalactiae*; e *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Erysipelothrix spp.*, *Listeria spp.*, *Micrococcus spp.* e *Mycobacterium spp.*, *Kytococcus spp.*

5 e *Erysipelothrix spp.* Desta maneira, o anticorpo produzido usando uma composição de polipeptídeos da invenção pode ser usado para identificar e caracterizar polipeptídeos da invenção independentes da origem, fonte e/ou maneira de obtenção do polipeptídeo.

A presente invenção refere-se também ao uso de tal anticorpo
10 para se direcionar a um micróbio expressando um polipeptídeo da presente invenção ou um polipeptídeo tendo um epítipo estruturalmente relacionado com um epítipo presente em um polipeptídeo da presente invenção. Um composto pode ser covalentemente ligado a um anticorpo onde o anticorpo pode ser, por exemplo, uma toxina. Da mesma maneira, tais compostos po-
15 dem ser covalentemente ligados a um sideróforo bacteriano para se direcionar ao micróbio. O acoplamento químico ou conjugação de um anticorpo da presente invenção, ou uma porção do mesmo (tal como um fragmento Fab), pode ser realizado usando métodos conhecidos e de rotina.

Em um aspecto a invenção refere-se também a tratamento de
20 uma infecção em um animal, incluindo um ser humano, causada por um micróbio gram-positivo, preferivelmente por um membro da família *Micrococca-ceae*, preferivelmente, *Staphylococcus spp.*, mais preferivelmente, *S. aureus*; membros da família *Streptococcaceae*, preferivelmente, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Strepto-*
25 *coccus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi*, ou *Streptococcus dysgalactiae*; *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Erysipelothrix spp.*, *Kytococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Micrococcus spp.*, *Mycobacterium spp.* e *Erysipelothrix spp.* Conforme aqui usado, o termo "infecção" refere-se à presença de um micróbio gram-positivo no corpo
30 de um animal, que pode ou não ser clinicamente aparente. Um animal com uma infecção por um membro do gênero *Staphylococcus* que não é clinicamente aparente é frequentemente referido como veículo assintomático.

Tratamento de uma infecção pode ser profilático ou, alternativamente, pode ser iniciado após o animal ser infectado pelo micróbio. Tratamento que é profilático, por exemplo, iniciado antes de um indivíduo ser infectado por um micróbio ou enquanto qualquer infecção permanece subclínica – é referido aqui como tratamento de um indivíduo que está "sob risco" de infecção. Conforme aqui usado, o termo "sob risco" refere-se a um animal que pode ou não realmente possuir o risco descrito. Desta maneira, tipicamente, um animal "sob risco" de infecção por um micróbio é um animal presente em uma área onde animais foram identificados como infectados pelo micróbio e/ou prováveis de serem expostos ao micróbio mesmo se o animal não tiver ainda manifestado qualquer indicação detectável de infecção pelo micróbio e sem importar se o animal pode carregar uma quantidade subclínica do micróbio. Desta maneira, administração de uma composição pode ser realizada antes, durante ou após o animal ter primeiro contato com o micróbio. Tratamento iniciado após o primeiro contato do animal com o micróbio pode resultar em diminuição da severidade de sintomas e/ou sinais clínicos de infecção pelo micróbio, remoção completa do micróbio e/ou diminuição da probabilidade de ter uma infecção clinicamente evidente comparado com um animal ao qual a composição não é administrada. O método inclui administração de uma quantidade eficaz da composição da presente invenção a um animal tendo, ou sob risco de ter, uma infecção causada por um micróbio gram-positivo, e determinação de se o número de micróbios causando a infecção diminuiu. Neste aspecto da invenção, uma "quantidade eficaz" é uma quantidade eficaz para reduzir o número dos micróbios especificados em um animal ou reduzir a probabilidade de que o animal tenha uma infecção clinicamente evidente comparado com um animal ao qual a composição não é administrada. Métodos para determinação de se uma infecção é causada por um micróbio gram-positivo são rotina e conhecidos na técnica e são métodos para determinar se a infecção diminuiu.

Em outro aspecto, a presente invenção refere-se a métodos para tratamento de um ou mais sintomas ou sinais clínicos de certas condições em um animal que podem ser causados por infecção por um micróbio gram-

positivo, preferivelmente por um membro da família *Micrococcaceae*, preferivelmente, *Staphylococcus spp.*, mais preferivelmente, *S. aureus*; membros da família *Streptococcaceae*, preferivelmente, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*,
5 *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi* ou *Streptococcus dysgalactiae*; *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Erysipelothrix spp.*, *Kytococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Micrococcus spp.*, *Mycobacterium spp.* e *Erysipelothrix spp.* O método inclui a administração de uma quantidade eficaz de uma composição da presente invenção a um animal
10 tendo ou sob risco de ter uma condição, ou exibindo sintomas e/ou sinais clínicos de uma condição, e determinação de se pelo menos um sintoma e/ou sinal clínico da condição é mudado, preferivelmente, reduzido. Exemplos de condições e/ou sinais clínicos causados por infecções microbianas incluem, por exemplo, mastite, septicemia, pneumonia, meningoencefalite,
15 limfangite, dermatite, infecções do trato urinário, estrangulamentos, metrite, doença perinatal, abscessos da pituitária, artrite, bursite, orquite, cistite e pielonefrite, linfadenite caseosa, tuberculose, linfangite ulcerativa, listeriose, erisipelas, laminite, antrax, doença de tyzzer, tétano, botulismo, enterite, edema maligno, abraxia, hemoglobínúria bacilar, enterotoxemia, lesões da
20 pele necróticas e infecções nosocomiais. Exemplos de condições causadas por *S. aureus* também incluem, por exemplo, botriomicose em cavalos, sinovite purulenta e osteomielite em ave, abortos em suíno e piemia pelo carrapato em cordeiros. Exemplos de condições causadas por *Streptococcus spp.* também incluem, por exemplo, dor de garganta, febre escarlate, impetigo,
25 endocardite ulcerativa, febre reumática e glomerulonefrite pós-streptococcal, cervicite em seres humanos, cervicite em equino e suíno e meningite e abscessos da papada em suíno.

Tratamento de sintomas e/ou sinais clínicos associados com essas condições pode ser profilático ou, alternativamente, pode ser iniciado
30 após o desenvolvimento de uma condição descrita aqui. Conforme aqui usado, o termo "sintomas" refere-se a uma evidência subjetiva de doença ou condição sofrida pelo paciente e causada por infecção por um micróbio.

Conforme aqui usado, o termo "sinal clínico" ou simplesmente "sinal" refere-se à evidência objetiva de doença ou condição causada por infecção por um micróbio. Sintomas e/ou sinais clínicos associados com condições referidas aqui e as avaliações de tais sintomas são rotina e conhecidos na técnica.

5 Tratamento que é profilático, por exemplo, iniciado antes de um indivíduo manifestar sintomas ou sinais de uma condição causada por um micróbio, é referido aqui como tratamento de um indivíduo que "está sob risco" de desenvolver a condição. Desta maneira, tipicamente um animal "sob risco" de desenvolver uma condição é um animal presente em uma área onde animais
10 tendo a condição foram diagnosticados e/ou é provável de ser exposto a um micróbio causador da condição mesmo se o animal ainda não manifestou sintomas ou sinais de qualquer condição causada pelo micróbio. Desta maneira, administração de uma composição pode ser realizada antes, durante ou após a ocorrência das condições descritas aqui. Tratamento iniciado após
15 o desenvolvimento de uma condição pode resultar em diminuição da severidade dos sintomas de uma das condições ou remoção completa dos sintomas. Neste aspecto da invenção uma "quantidade eficaz" é uma quantidade eficaz para prevenir a manifestação de sintomas de uma doença, diminuir a severidade dos sintomas de uma doença e/ou remover completamente os
20 sintomas. O tratamento bem sucedido de uma infecção microbiana gram-positiva em um animal é revelado no Exemplo 5, que demonstra a proteção contra doença causada por *S. aureus* em modelos de camundongo através da administração de uma composição da presente invenção. Esses modelos de camundongo são um modelo geralmente aceito para o estudo de doença
25 humana causada por esses micróbios. O tratamento bem sucedido de uma infecção microbiana gram-positiva em um animal é também revelado nos Exemplos 10 a 12, que demonstram que administração de uma composição da presente invenção provê proteção contra doença causada por *S. aureus* em vacas.

30 A presente invenção também provê métodos para diminuição da colonização por micróbios gram-positivos, por exemplo, bloqueio dos sítios de ligação de micróbio gram-positivo, incluindo tecidos do sistema esquelético

(por exemplo, ossos, cartilagem, tendões e ligamentos), sistema muscular (por exemplo, músculos esquelético e liso), sistema circulatório (por exemplo, coração, vasos sanguíneos, capilares e sangue), sistema nervoso (por exemplo, cérebro, cordão espinhal e nervos periféricos), sistema respiratório (por exemplo, nariz, traqueia, pulmões, brônquios, bronquiolos, alvéolos), sistema digestivo (por exemplo, boca, glândulas salivares, esôfago, fígado, estômago, intestinos grosso e delgado), sistema excretor (por exemplo, rins, uréteres, bexiga e uretra), sistema endócrino (por exemplo, hipotálamo, pituitária, tireoide, pâncreas e glândulas adrenais), sistema reprodutor (por exemplo, ovários, ovidutos, útero, vagina, glândulas mamárias, testículos e vesículas seminais), sistemas linfático/imune (por exemplo, linfa, nós linfáticos e vasos, células sanguíneas mononucleares ou brancas, tais como macrófagos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos, incluindo células T e células B) e linhagens de célula específicas (por exemplo, células precursoras, células epiteliais, células-tronco) e similar. Preferivelmente, o micróbio gram-positivo é um membro da família *Micrococcaceae*, preferivelmente, *Staphylococcus spp.*, mais preferivelmente, *S. aureus*; um membro da família *Streptococcaceae*, preferivelmente, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equi* ou *Streptococcus dysgalactiae*; *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Erysipelothrix spp.*, *Kytococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Micrococcus spp.*, *Mycobacterium spp.* e *Erysipelothrix spp.*

Diminuição da colonização em um animal pode ser realizada profilaticamente ou, alternativamente, pode ser iniciada após o animal ser colonizado pelo micróbio. Tratamento que é profilático – por exemplo, iniciado antes de um indivíduo ser colonizado por um micróbio ou enquanto qualquer colonização permaneça não-detectada – é referido aqui como tratamento de um indivíduo que está "sob risco" de colonização pelo micróbio. Desta maneira, tipicamente, um animal "sob risco" de colonização por um micróbio é um animal presente em uma área onde os animais foram identificados como colonizados pelo micróbio e/ou é provável que sejam expostos

ao micróbio mesmo se o animal não tiver ainda manifestado qualquer indicação detectável de colonização pelo micróbio e sem importar se o animal pode carregar um número de subcolonização do micróbio. Desta maneira, administração de uma composição pode ser realizada antes, durante ou após
5 ou animal ter o primeiro contato com o micróbio. Tratamento iniciado após o primeiro contato do animal com o micróbio pode resultar em diminuição do grau de colonização pelo micróbio, remoção completa do micróbio e/ou diminuição da probabilidade que o animal seja colonizado pelo micróbio comparado com um animal ao qual a composição não é administrada. Desta
10 maneira, o método inclui administração de uma quantidade eficaz de uma composição da presente invenção a um animal colonizado por, ou sob risco de ser colonizado por, um micróbio gram-positivo. Neste aspecto da invenção, uma "quantidade eficaz" é uma quantidade suficiente para diminuir a colonização do animal pelo micróbio, onde colonização menor refere-se a
15 um ou mais de: diminuição do grau de colonização pelo micróbio, remoção completa do micróbio e/ou diminuição da probabilidade que o animal seja colonizado pelo micróbio comparado com um animal ao qual a composição não é administrada. Métodos para varredura da colonização de um animal por um micróbio são rotina e conhecidos na técnica. Por exemplo, coloniza-
20 ção do trato intestinal de um animal por um micróbio pode ser determinada através da medição da presença do micróbio nas fezes do animal. É esperado que diminuição da colonização de um animal por um micróbio vá reduzir a transmissão do micróbio para seres humanos.

Uma composição da invenção pode ser usada para prover imunização ativa ou passiva contra infecção bacteriana. Em geral, a composição
25 pode ser administrada a um animal para prover imunização ativa. No entanto, a composição pode ser também usada para induzir produção de produtos imunes, tais como anticorpos, que podem ser coletados do animal produtor e administrados a outro animal para prover imunidade passiva. Componentes
30 imunes, tais como anticorpos, podem ser coletados para preparar composições (preferivelmente contendo anticorpo) a partir de soro, plasma, sangue, colostro, etc, para terapias de imunização passiva. Composições de anticor-

po incluindo anticorpos monoclonais e/ou antiidiotipos podem ser também preparadas usando métodos conhecidos. Anticorpos quiméricos incluem regiões constantes derivadas de humano de ambas as cadeias pesada e leve e regiões variáveis derivadas de murino que são antígeno-específicas (Morrison e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81(21):6851-5; LoBuglio e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86(11):4220-4; Boulianne e outros, *Nature*, 1984, 312(5995):643-6.). Anticorpos humanizados substituem as regiões constante e de estrutura principal de murino (FR) (da região variável) com as contrapartes humanas (Jones e outros, *Nature*, 1986, 321(6069):522-5; Riechmann e outros, *Nature*, 1988, 332(6162):323-7; Verhoeven e outros, *Science*, 1988, 239(4847):1534-6; Queen e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86(24):10029-33; Daugherty e outros, *Nucleic Acids Res.*, 1991, 19(9): 2471-6.). Alternativamente, certas linhagens de camundongo podem ser usadas, as quais foram geneticamente engenheiradas para produzir anticorpos que são quase que completamente de origem humana; seguindo imunização as células B desses camundongos são coletadas e imortalizadas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Bruggeman e Taussig, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1997, 8(4):455-8; Lonberg e Huszar, *Int. Rev. Immunol.*, 1995;13(1):65-93; Lonberg e outros, *Nature*, 1994, 368:856-9; Taylor e outros, *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20:6287-95.). Composições de anticorpo passivo e fragmentos do mesmo, por exemplo, scFv, Fab, F(ab')₂ ou Fv ou outras formas modificadas do mesmo, podem ser administrados a um recipiente na forma de soro, plasma, sangue, colostro e similar. No entanto, os anticorpos podem ser também isolados de soro, plasma, sangue, colostro e similar usando métodos conhecidos para uso posterior em uma forma concentrada ou reconstituída tal como, por exemplo, soluções de lavagem, revestimento impregnado e/ou agentes tópicos e similar. Preparações de imunização passiva podem ser particularmente vantajosas para o tratamento de doença sistêmica aguda ou imunização passiva de animais jovens que falharam em receber níveis adequados de imunidade passiva através do colostro materno. Anticorpos úteis para imunização passiva podem ser também úteis para conjugar a vários fármacos ou antibióti-

cos que poderiam ser diretamente direcionados a bactérias expressando durante uma infecção sistêmica ou localizada um polipeptídeo da presente invenção ou um polipeptídeo tendo um epítipo estruturalmente relacionado a um epítipo presente em um polipeptídeo da presente invenção.

5 Modelos animais, em particular modelos de camundongo, estão disponíveis para varredura experimental das composições da presente invenção. Esses modelos de camundongo são geralmente modelos aceitos para o estudo de doença humana causada por membros do gênero *Staphylococcus* e *S. aureus* em particular. Naqueles casos onde um membro do
10 gênero *Staphylococcus* causa doença em um animal, por exemplo, uma vaca, o hospedeiro natural pode ser usado para avaliar experimentalmente as composições da presente invenção.

No entanto, proteção em um modelo de camundongo não é apenas a única maneira de avaliar se uma composição pode conferir proteção
15 a um animal contra infecção por um *Staphylococcus spp.* A resposta imune adaptativa consiste em duas divisões principais: a resposta humoral (anticorpo) e a resposta celular (célula T). Seguindo infecção por um patógeno bacteriano, células dendríticas no sítio de infecção encontram antígenos microbianos e produzem moléculas de sinalização tais como, por exemplo, re-
20 ceptores de superfície e citocinas em resposta a padrões moleculares conservados associados com a bactéria específica. Esses sinais são modelados pela natureza do patógeno e levam idealmente às respostas de anticorpo e célula T apropriadas que protegem o hospedeiro da doença. Embora algumas doenças bacterianas sejam controladas principalmente através de fun-
25 ções do anticorpo, outras requerem respostas de célula T ou ambas as respostas de anticorpo e célula T para proteção. O objetivo de biologia de vacina é identificar as respostas imunes que proveem proteção e então projeto de uma vacina para reproduzir uma ou mais dessas respostas em seres hu-
manos.

30 Anticorpos podem ter muitas funções diferentes em conferir proteção contra infecção tais como, por exemplo, fixação de complemento, opsonização, neutralização e/ou aglutinação. Além disso, algumas subclasses

de anticorpos são melhores do que outras em funções específicas; por exemplo, para fixação de complemento a hierarquia que segue existe para subclasses de IgG humana: IgG3>IgG1>IgG2>IgG4).

5 Funções imunológicas de anticorpo podem ser estudadas de uma variedade de maneiras. Por exemplo, *Western blots* são usados para identificar ligação específica de antígeno com base em tamanho de proteínas separadas, enquanto o ensaio imunoabsorvente ligado à enzima padrão (ELISA) é usado para produzir informação quantitativa sobre títulos de anticorpo dentro do soro. Estudos de ligação de superfície de anticorpo são usados para determinar se anticorpos em soro são capazes reconhecer antígenos na superfície de bactérias intactas, um indicador importante de se os anticorpos têm o potencial em ter atividade *in vivo*. Desta maneira, um versado na técnica reconhece que ensaios de ligação de anticorpo tais como um *Western blot*, ELISA (por exemplo, usando antissoro) e/ou de ligação de superfície se relacionam positivamente com os antígenos se ligando especificamente provendo atividade imunológica contra infecção por *Staphylococcus spp.* (Vytvytska e outros 2002, *Proteomics* 2:580-590; Kuklin e outros 2006, *Infect. Immun.* 74(4):2215-2223; Dryla e outros 2005, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 12(3):387-398). No entanto, um versado na técnica reconhece ainda que uma falta de ligação de anticorpo em um ensaio tal como, por exemplo, um *Western blot*, ELISA ou ensaio de ligação de superfície não significa que o antígeno ensaiado falha em prover atividade imunológica contra infecção por *Staphylococcus spp.* (Kim HK e outros. "IsdA e IsdB antibodies protect mice against *Staphylococcus aureus* abcess formation and lethal challenge". *Vaccine* (2010), doi:10.1016/j.vaccine.2010.02.097).

25 A Figura 202 mostra que soro de camundongo convalescente se liga a pelo menos MntC recombinantemente produzida (SEQ ID NO:419), SYN2 recombinantemente produzida (SEQ ID NO:386), SirA recombinantemente produzida (SEQ ID NO:375) e Opp1A recombinantemente produzida (SEQ ID NO:364), indicando que cada um dos polipeptídeos recombinantemente produzidos ligados pode induzir atividade imunológica contra infecção por *Staphylococcus spp.*

A Figura 204 mostra que soro humano convalescente se liga à PflB recombinantemente produzida (SEQ ID NO:353), Opp1A recombinantemente produzida (SEQ ID NO:364), SirA recombinantemente produzida (SEQ ID NO:375), SYN2 recombinantemente produzida (SEQ ID NO:386),
5 FhuD recombinantemente produzida (SEQ ID NO:397), SYN1 recombinantemente produzida (SEQ ID NO:408) e MntC recombinantemente produzida (SEQ ID NO:419), indicando que cada um dos polipeptídeos recombinantemente produzidos pode induzir atividade imunológica contra infecção por *Staphylococcus spp.*

10 A Figura 205 mostra que anticorpo criado contra FhuD recombinantemente produzida (SEQ ID NO:397), Opp1A recombinantemente produzida (SEQ ID NO:364) e PflB recombinantemente produzida (SEQ ID NO:353) se liga à superfície de células de *Staphylococcus spp.*, indicando que cada um dos alvos de polipeptídeo do anticorpo de ligação à célula pode
15 induzir atividade imunológica contra infecção por *Staphylococcus spp.*

Técnicas tais como ensaios de opsonofagocitose (OPA), onde bactérias ligadas a anticorpo e complemento são combinadas com fagócitos humanos ou de camundongo para determinar os níveis de morte bacteriana, são úteis para estudo de função de anticorpo. Resultados de OPA positivos
20 se relacionam com proteção induzida por vacina em um modelo de camundongo (Stranger-Jones e outros 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(45):16942-16947). Um ensaio de queima oxidativa similar pode ser usado para avaliar o nível de espécies oxigênio reativas (ROS) por neutrófilos humanos ou de camundongo frescos seguindo interação com bactérias ligadas a anticorpo e
25 complemento.

Em alguns casos, uma pessoa pode determinar que um polipeptídeo candidato possui atividade imunológica mediada por célula e, então, o polipeptídeo candidato pode exibir atividade imunológica na ausência de indução da produção de anticorpos. (Spellberg e outros 2008, *Infect. Immun.*
30 76(10):4575-4580). Células T citotóxicas ou CD8 matam principalmente células infectadas diretamente através de vários mecanismos efetores, enquanto células T CD4 auxiliares funcionam para prover sinalização importante na

maneira de citocinas. Essas classes de célula T podem ser subdivididas mais com base nas citocinas que elas produzem, e subclasses diferentes são eficazes contra patógenos bacterianos diferentes. Células T são frequentemente estudadas através da varredura de seus fenótipos com citometria de fluxo, onde os anticorpos são usados para visualizar os níveis de marcadores de superfície específicos que permitem classificação das células T como, por exemplo, uma célula T CD4+ recentemente ativada, uma célula T CD8+ de memória, etc. Ainda, citocinas e outros produtos de células T podem ser estudados através do isolamento das células T do tecido linfóide e reestimulação delas com antígeno cognato. Seguindo estimulação de antígeno as células T produzem citocinas que podem ser visualizadas através de, por exemplo, tingimento com citocina intracelular acoplado com citometria de fluxo ou coleta dos sobrenadantes celulares e uso de tecnologia de conta Luminex para medir 15-25 citocinas simultaneamente.

A Figura 206 mostra que uma composição (rSIRP7) que inclui PflB recombinantemente produzida (SEQ ID NO:353), Opp1A recombinantemente produzida (SEQ ID NO:364), SirA recombinantemente produzida (SEQ ID NO:375), SYN2 recombinantemente produzida (SEQ ID NO:386), FhuD recombinantemente produzida (SEQ ID NO:397), SYN1 recombinantemente produzida (SEQ ID NO:408) e MntC recombinantemente produzida (SEQ ID NO:419) induz um perfil de citocina similar ao perfil de citocina induzido pelo extrato de SIRP demonstrado prover atividade imunológica contra infecção por *Staphylococcus spp.* A composição de rSIRP7 induziu a produção de, por exemplo, IL-2, IL-6, IL-17, IFN- γ , MIP-2 e GM-CSF.

Desta maneira, em adição a modelos de camundongo, aqueles versados na técnica reconhecem que atividade imunológica comensurada com os métodos descritos aqui pode se relacionar com qualquer um ou mais do que segue: dados de *Western blot* mostrando que soro de animais expostos a *Staphylococcus spp.* contém anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo candidato, ensaios de ligação de superfície celular demonstrando que anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo candidato se liga especificamente a *Staphylococcus spp.*, dados de opsonofagocito-

se e indução de citocina.

Outro aspecto da presente invenção provê métodos para detecção de anticorpo que se liga especificamente a polipeptídeos da presente invenção. Esses métodos são úteis na, por exemplo, detecção de se um animal tem anticorpo que se liga especificamente a polipeptídeos da presente invenção e diagnóstico de se um animal pode ter uma condição causada por um micróbio expressando polipeptídeos descritos aqui ou expressando polipeptídeos que compartilham epítomos com os polipeptídeos descritos aqui. Tais sistemas de diagnóstico podem estar em forma de kit. O método inclui contato de um anticorpo com uma preparação que inclui um polipeptídeo da presente invenção para resultar em uma mistura. O anticorpo pode estar presente em uma amostra biológica, por exemplo, sangue, leite ou colostro. O método inclui ainda incubação da mistura sob condições para permitir que o anticorpo se ligue especificamente ao polipeptídeo para formar um complexo polipeptídeo:anticorpo. Conforme aqui usado, o termo "complexo polipeptídeo:anticorpo" refere-se ao complexo que resulta quando um anticorpo se liga especificamente a um polipeptídeo. A preparação que inclui os polipeptídeos da presente invenção pode também incluir reagentes, por exemplo, um tampão, que proveem condições apropriadas para a formação do complexo polipeptídeo:anticorpo. O complexo polipeptídeo:anticorpo é então detectado. A detecção de anticorpo é conhecida na técnica e pode incluir, por exemplo, imunofluorescência ou peroxidase. Os métodos para detecção da presença de anticorpos que se ligam especificamente a polipeptídeos da presente invenção podem ser usados em vários formatos que foram usados para detectar anticorpo, incluindo radioimunoensaio e ensaio imunoabsorvente ligado à enzima.

A presente invenção também provê um kit para detecção de anticorpo que se liga especificamente a polipeptídeos da presente invenção. O anticorpo detectado pode ser obtido de um animal suspeito de ter uma infecção causada por um micróbio gram-positivo, mais preferivelmente, um membro da família *Micrococcaceae*, preferivelmente, *Staphylococcus spp.*, mais preferivelmente, *S. aureus*; *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium*

spp., *Corynebacterium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Erysipelothrix spp.*, *Kytococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Micrococcus spp.*, *Mycobacterium spp.*, e *Erysipelothrix spp.*

O kit inclui pelo menos um dos polipeptídeos da presente invenção (por exemplo, um, pelo menos dois, pelo menos três, etc) em um material de embalagem adequado em uma quantidade suficiente para pelo menos um ensaio. Opcionalmente, outros reagentes tais como tampões e soluções necessários para prática da invenção podem ser também incluídos. Por exemplo, um kit pode também incluir um reagente para permitir detecção de um anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo da presente invenção, tal como um anticorpo secundário detectavelmente marcado projetado para se ligar especificamente a um anticorpo obtido de um animal. Instruções para uso dos polipeptídeos embalados são também tipicamente incluídas. Conforme aqui usado, a expressão "material de embalagem" refere-se a uma ou mais estruturas físicas usadas para alojar os teores do kit. O material de embalagem é construído através de métodos bem conhecidos, em geral para prover um ambiente livre de contaminante, estéril. O material de embalagem pode ter um rótulo que indica que os polipeptídeos podem ser usados para detecção de anticorpo que se liga especificamente a polipeptídeos da presente invenção. Ainda, o material de embalagem contém instruções indicando como os materiais dentro do kit são empregados para detectar o anticorpo. Conforme aqui usado, o termo "embalagem" refere-se a um recipiente tal como vidro, plástico, papel, folha, e similar, capaz de conter dentro de limites fixados os polipeptídeos, e outros reagentes, por exemplo, um anticorpo secundário. Desta maneira, por exemplo, uma embalagem pode ter uma cavidade de placa de microtitulação à qual quantidades em micrograma de polipeptídeos foram afixadas. Uma embalagem pode também conter um anticorpo secundário. "Instruções para uso" tipicamente incluem uma expressão tangível descrevendo a concentração de reagente ou pelo menos um parâmetro de método de ensaio tais como as quantidades relativas de reagente e amostra a serem misturadas, períodos de tempo de manutenção para misturas de reagente/amostra, temperatura, condições de

tampão e similar.

A presente invenção é ilustrada pelos exemplos que seguem. Deve ser também compreendido que os exemplos, materiais, quantidades e procedimentos particulares devem ser interpretados amplamente de acordo com o escopo e o espírito da invenção conforme aqui descrito.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Preparação de proteínas reguladas por ferro

Escala de Laboratório

10 Composições derivadas de linhagens diferentes de *Staphylococcus aureus* incluindo proteínas novas expressas sob restrição de ferro e/ou outros graus de quelação com íon de metal foram avaliadas quanto à eficácia contra uma provocação virulenta em camundongos. A eficácia da composição foi avaliada através da coleta de dados nos parâmetros que seguem

15 (1) a eficácia de cada composição para prover proteções homóloga e heteróloga contra uma provocação virulenta viva em camundongos, (2) a eficácia de cada composição em reduzir as lesões de pele necróticas e (3) a eficácia de composições derivadas de *Staphylococcus* cultivada em condições com e sem ferro em prover proteção.

20 As linhagens de *Staphylococcus aureus* avaliadas neste estudo tiveram origem de três espécies animais: ave, humano e bovino. O isolato de ave SAAV1 era um isolato de campo tendo origem em um bando de perus doentes tendo grau alto de osteomielite e sinovite. Os isolatos bovinos (linhagem 1477 e linhagem 2176) foram isolados de dois rebanhos leiteiros comerciais tendo uma alta incidência de mastite clínica. O isolato humano foi

25 obtido da ATCC (linhagem 19636) e originado de um paciente tendo osteomielite clínica.

Estoques de semente máster de cada isolato foram preparados através da inoculação do isolato apropriado em 200 ml de Caldo de Soja Triptico (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI) contendo 300 μ M de 2,2-dipiridila (Sigma-Aldrich St. Louis, MO). A cultura foi cultivada enquanto agitando a 200 rpm por 6 horas a 37° C e coletada através de centrifugação a

30

10.000 x g. O pélete bacteriano foi ressuspense em 100 ml de caldo TBS contendo glicerol 20% e esterilmente disperso em frascos criogênicos de 2 ml (1 ml por frasco) e armazenado a -90° C até o uso.

Cada estoque de semente máster foi expandido em uma semente de trabalho. Um frasco de cada isolato de semente máster foi inoculado em 200 ml de Caldo de Soja Tríptico (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI) contendo 1000 µl de 2,2-dipiridila (Sigma-Aldrich St. Louis, MO). A cultura foi cultivada enquanto agitando a 200 rpm por 6 horas a 37° C e coletada através de centrifugação a 10.000 x g. O pélete bacteriano foi ressuspense em 100 ml de caldo TBS contendo glicerol 20% e aplicado esterilmente em frascos criogênicos de 2 ml (1 ml por frasco) e armazenado a -90° C até uso. A semente de trabalho foi usada para a produção de composições enriquecidas com proteínas de membrana reguladas por ferro, incluindo proteínas de membrana reguladas por ferro.

Todas as linhagens foram adaptadas para crescerem em meios altamente depletados de ferro (isto é, meios contendo níveis muito baixos de ferro livre). Isto foi realizado através de subcultura das bactérias em TSB contendo concentrações altas de 2,2-dipiridila (de 300 a 1600 µM).

As proteínas foram preparadas a partir de bactérias como segue. As bactérias foram cultivadas a partir de estoques de semente de trabalho congelados através de subcultura em 25 ml de meios isentos de ferro (contendo 1000 µM de 2,2'-dipiridila) e meios com ferro, então incubadas a 37° C enquanto agitando a 400 rpm. Seguindo 12 horas de incubação, 5 ml de cada cultura foram transferidos para 500 ml de meios isentos de ferro ou com ferro pré-incubados a 37° C. As culturas foram incubadas por 8 horas a 37° C enquanto agitando a 100 rpm, então as células foram peletizadas através de centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos. Os péletes bacterianos foram ressuspensos em 100 ml de solução salina fisiológica estéril e centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos. Os péletes foram então ressuspensos em 45 ml de solução salina tamponada com Tris, pH 7,2 (TBS; Tris 25 mM, NaCl 150 mM) e as suspensões bacterianas resultantes foram despejadas como alíquotas de 9 ml em 5 tubos individuais. Um mililitro de TBS contendo 50 uni-

dades de lisostafina (Sigma, St. Louis, MO) foi adicionado a cada tubo para dar um volume final de 5 unidades/ml. Seguindo incubação a 37° C por 30 minutos enquanto agitando a 200 rpm, 1 ml de TBS contendo 0,1 mg de lisozima (Sigma) foi adicionado a cada tubo. As suspensões bacterianas foram então incubadas por mais 45 minutos enquanto agitando a 200 rpm. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 3050 x g por 12 minutos a 4° C para peletizar restos celulares grandes. Os sobrenadantes foram coletados através de aspiração sem perturbar o pélete. O sobrenadante foi então centrifugado a 39.000 x g por 2,5 horas. Os péletes resultantes contendo as proteínas foram ressuspensos em 200 µL de tampão Tris, pH 7,2, sem solução salina. A solução de proteína para cada isolado foi combinada para um volume total de 1 ml e armazenada a -90° C.

Os extratos enriquecidos em proteína derivados de *S. aureus* foram fracionados em tamanho em géis SDS-PAGE usando um gel de empilhamento 4% e gel de separação 10%. Amostras para eletroforese foram preparadas combinando 10 µl de amostra com 30 µl de tampão de amostra de redução SDS (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, glicerol 20%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5%) e fervidas por 4 minutos. As amostras sofreram eletroforese em corrente constante de 18 mA por 5 horas a 4° C usando um fornecimento de energia de célula xi Protein II (BioRad Laboratories, Richmond, CA, modelo 1000/500). O peso molecular de cada proteína individual conforme visualmente visto no gel de SDS-PAGE foi estimado usando um densitômetro (BioRad) usando um marcador de peso molecular de faixa ampla como um padrão de referência (BioRad).

Os padrões de SDS-PAGE das proteínas de cada isolato quando cultivadas na presença de 1600 µM de dipiridila mostraram um padrão de expressão de proteína muito diferente comparado com a mesma linhagem quando cultivada na presença de 300 µM de dipiridila. Por exemplo, quando cultivada em 300 µM de isolato de dipiridila SAAV1 resultou em proteínas reguladas por metal de 90 kDa, 84 kDa, 72 kDa, 66 kDa, 36 kDa, 32 kDa e 22 kDa, enquanto cultivada em 1600 µM de dipiridila resultou em proteínas reguladas por metal de 87,73 kDa, 54,53 kDa, 38,42 kDa, 37,37 kDa, 35,70

kDa, 34,91 kDa e 33,0 kDa. Da mesma maneira, quando cultivado em 300 μM de isolato de dipiridila 19636 resultou em proteínas de 42 kDa e 36 kDa, enquanto cultivo em 1600 μM de dipiridila resultou em proteínas reguladas por metal de 87,73 kDa, 54,53 kDa, 38,42 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa e 33,0 kDa. Todas as condições, incluindo cultivo em meios com ferro, resultaram na expressão das proteínas que seguem que eram presumivelmente não-reguladas por metal: 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa e 40 kDa.

Ainda, cultivo de linhagens diferentes de *S. aureus* em 1600 μM de dipiridila resultou em padrões de expressão de proteína similares. As composições enriquecidas em proteínas de membrana reguladas por ferro de isolato de ave (SAAV1) incluíam proteínas com pesos moleculares de 87,73 kDa, 54,54 kDa, 38,42 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa e 33,0 kDa. Os pesos moleculares das proteínas do isolato ATCC 19636 foram essencialmente idênticos àqueles do isolato de ave. Ambos os isolatos de bovino, quando cultivados com 1600 μM de 2,2-dipiridila, expressaram perfis de formação de faixa similares aos isolatos de ave e ATCC para a maioria das proteínas (87,73 kDa, 54,53 kDa, 37,7 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa e 33,0 kDa). No entanto, nenhum dos isolatos bovinos produziu a proteína de 38,42 kDa vista com os isolatos de ave e ATCC e os isolatos bovinos expressaram três proteínas (80,46 kDa, 65,08 kDa e 31,83 kDa) não observadas com as linhagens de ave e ATCC (vide Figura 1 e Tabela 7). Todas as condições resultaram na expressão das proteínas que seguem que não eram reguladas por metal: 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa e 40 kDa.

Tabela 7. Pesos moleculares de polipeptídeos regulados por metal obtidos de isolatos de *Staphylococcus aureus*.

Aviária SAAV1	Humana 19636	Bovina 1477	Bovina 2176
87,73	87,73	87,73	87,73
-	-	80,46	80,46
-	-	65,08	65,08
54,53	54,53	54,53	54,53

Aviária SAAV1	Humana 19636	Bovina 1477	Bovina 2176
38,42	38,42	-	-
37,37	37,37	37,37	37,37
35,70	35,70	35,70	35,70
34,91	34,91	34,91	34,91
33,0	33,0	33,0	33,0
		31,83	31,83

Interessantemente, não houve nenhuma diferença em perfis de proteína conforme examinado através de SDS-PAGE entre o sobrenadante clarificado e o pélete bacteriano após tratamento das bactérias com lisostafina/lisozima. Ambos o pélete bacteriano e o sobrenadante extraídos tinham exatamente os mesmos perfis de proteína conforme examinado através de SDS-PAGE. Esta mesma observação foi vista também quando rompendo as células bacterianas usando um homogeneizador AVESTIN a 206,84Mpa (30.000 psi). O pélete bacteriano resultante, após centrifugação em velocidade lenta, era idêntico em seu perfil de proteína comparado com o sobrenadante clarificado após centrifugação em alta velocidade a 30.000 x g por 2,0 horas a 4° C.

Exemplo 2

Preparação das composições de imunização derivadas de *Staphylococcus aureus*

As proteínas do isolato humano ATCC 19636 e do isolato bovino 1477, cultivadas em condições isentas de ferro e preparadas conforme descrito no Exemplo 1, foram usadas para formular duas composições de vacina. As proteínas do isolato ATCC tinham pesos moleculares de 87,73 kDa, 54,53 kDa, 38,42 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa e 33,0 kDa, enquanto o isolato bovino expressou proteínas tendo pesos moleculares de 87,73 kDa, 80,46 kDa, 65,08 kDa, 54,53 kDa, 37,7 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa, 33,0 kDa e 31,83 kDa. Cada composição também continha as proteínas que seguem que eram não-reguladas por metal: 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa e 40 kDa. Vacinas de estoque foram preparadas a partir das duas linhagens através de

emulsificação de cada suspensão de proteína aquosa (500 μ M de proteína total/ml) em um adjuvante comercial (EMULSIGEN, MVP Laboratories, Ralston, Nebraska) usando um recipiente de homogeneização IKA Ultra Turrax T-50 (IKA, Cincinnati, OH) para dar uma dose final de 50 μ g de proteína total em um volume injetável de 0,1 ml com uma concentração de adjuvante de 22,5% vol/vol. Como vacinação controle, uma composição de proteína foi preparada a partir do isolato bovino 1477 cultivado sob condições com ferro (TSB suplementado com 300 μ M de cloreto férrico) conforme descrito no Exemplo 1. Uma vacina de placebo foi preparada substituindo a suspensão de proteína aquosa por solução salina fisiológica no protocolo acima.

Exemplo 3

Vacinação de camundongo

Setenta (N=70) camundongos fêmeas CF-1 obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) pesando 16-22 gramas foram igualmente distribuídos em 7 grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos foram alojados em gaiolas para camundongo de policarbonato (Ancore Corporation, Bellmore, NY). Uma gaiola única foi usada para cada grupo de tratamento e comida e água foram fornecidas *ad libitum* a todos os camundongos. Todos os camundongos foram vacinados intraperitonealmente com 0,1 ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:

Grupo 1: Vacinado com placebo

Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 19636 expressas sob restrição de ferro

Grupo 3: Vacinado com placebo

Grupo 4: Vacinado com proteínas 1477 Bovinas expressas sob restrição de ferro.

Grupo 5: Vacinado com proteínas 1477 Bovinas expressas sob restrição de ferro.

Grupo 6: Vacinado com proteínas 19636 ATCC expressas sob restrição de ferro.

Grupo 7: Vacinado com FeCl_3 1477 Bovina, onde " FeCl_3 1477

Bovina" refere-se a proteínas obtidas de 1477 Bovina cultivada em TSB suplementado com 300 µM de cloreto férrico.

Exemplo 4

Preparação de organismo de provocação

5 As linhagens de *Staphylococcus* previamente descritas ATCC 19636 e a linhagem 1477 foram usadas como organismos de provocação. Em suma, os isolatos de estoques congelados (previamente descritos) foram riscados em placas de ágar de sangue e incubados a 37° C por 18 horas. Uma única colônia de cada isolato foi subculturada em 50 ml de Caldo de

10 Soja Tríplico (Difco) contendo 1600 µL de 2,2'-dipiridila. As culturas foram incubadas a 37° C por 6 horas enquanto girando a 200 rpm, então centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos a 4° C para peletizar as bactérias. Os péletes bacterianos foram lavados duas vezes através de centrifugação em TBS a 4° C. Os péletes finais foram ressuspensos em TBS para uma densi-

15 dade óptica de 42% de Transmitância (T) a 562 nm em um volume de aproximadamente 25 ml de TBS e usados para provocação. Um pouco antes da provocação, 1 ml dessas suspensões bacterianas foi serialmente diluído e plaqueado em ágar para enumerar o número de unidades de formação de colônia (CFU) por dose de camundongo.

20 Exemplo 5

Provocação

Quatorze dias após a segunda vacinação, os camundongos em todos os grupos (1-7) foram subcutaneamente provocados na parte de trás do pescoço com 0,1 ml do organismo apropriado. Os sete grupos de camundongos foram provocados como segue:

25

Grupo-1 (Vacinado com Placebo): Provocado com ATCC 19636

Grupo-2 (Vacinado com proteína ATCC 19636 expressa sob restrição de ferro): Provocado com ATCC 19636

Grupo-3 (Vacinado com Placebo): Provocado com 1477 Bovina

30 Grupo-4 (Vacinado com proteínas 1477 Bovinas expressas sob restrição de ferro): Provocado com 1477 Bovina

Grupo-5 (Vacinado com proteínas 1477 Bovinas expressas sob

restrição de ferro): Provocado com ATCC 19636

Grupo-6 (Vacinado com proteínas ATCC 19636 expressas sob restrição de ferro): Provocado com 1477 Bovina

5 Grupo-7 (Vacinado com FeCl₃ 1477 Bovina): Provocado com 1477 Bovina

Conforme determinado através do protocolo de enumeração descrito no Exemplo 4, a concentração de *S. aureus* 19636 usada para provocação foi $1,35 \times 10^8$ CFU por dose de camundongo e a concentração de *S. aureus* 1477 usada para provocação foi $1,65 \times 10^8$ CFU de colônia por dose de camundongo. Morbidez, mortalidade e patologia foram registradas diariamente por 7 dias após a provocação.

Quando comparando os camundongos provocados com isolato ATCC 19636, 70% dos camundongos do Grupo 1 vacinados com placebo morreram dentro de 7 dias de provocação (Tabela 8 e Figura 2). Isto demonstrou que a linhagem 19636 causou uma taxa de mortalidade alta em camundongos no nível de dose administrado. Em contraste com os camundongos no Grupo 1, apenas 10% dos camundongos no Grupo 2 morreram dentro de 7 dias pós-provocação. Esses resultados ilustraram que os camundongos provocados com a linhagem 19636 eram significativamente protegidos por vacinação com a composição de 19636 ($p=0,020$, teste de Extra-
to de Fischer). Ainda, uma análise Kaplan-Meier dos dados de tempo-para-
morte indicou que a vacina forneceu proteção significativa ($p=0,0042$, teste logrank) contra provocação homóloga (Figura 3). Ainda, apenas 20% dos camundongos no Grupo 5 morreram dentro de 7 dias de provocação, indicando que a composição 1477 bovina ofereceu proteção significativa contra
provocação com a linhagem ATCC 19636 ($p = 0,015$ teste logrank para mortalidade). Quando os dados foram analisados através de uma curva de sobrevivência Kaplan-meier e teste logrank (Figura 4), a proteção contra mortalidade foi determinada ser significativa ($p = 0,015$ teste logrank para mortalidade), indicando que a composição de vacina derivada da linhagem 1477 proveu proteção heteróloga contra provocação com a linhagem 19636.

Tabela 8. Mortalidade de Camundongos Vacinados e Não-vacinados Seguindo Provocação com *Staphylococcus aureus* (isolato ACC 19636 humano e isolato bovino 1477).

Grupos	No. de Camundongos	No. de Mortos	Mortalidade percentual (%)
Grupo-1* (Placebo, Prov ATCC 19636)	10	7/10	70
Grupo-2* (ATCC 19636, Prov Homóloga)	10	1/10	10
Grupo-3* (Placebo, Prov 1477 Bovina)	10	2/10	20
Grupo-4* (1477 Bovina, Prov Homóloga)	10	1/10	10
Grupo-5* (1477 Bovina, Prov Heteróloga)	10	2/10	20
Grupo-6* (ATCC 19636, Prov Heteróloga)	10	0/10	0
Grupo-7* (FeCl ₃ 1477 Bovina, Prov 1477 Bovina)	10	2/10	20

5 *Grupo-1, (Vacinado com placebo/Provocado com ATCC 19636)

*Grupo-2 (Vacinado com proteínas ATCC 19636 expressas sob restrição de ferro/Provocado com ATCC 19636)

*Grupo-3 (Vacinado com placebo/Provocado com 1477 Bovina)

10 *Grupo 4 (Vacinado com proteínas 1477 Bovinas expressas sob restrição de ferro/Provocado com 1477 Bovina)

*Grupo-5 (Vacinado com proteínas 1477 Bovinas expressas sob restrição de ferro/Provocado com ATCC 19636)

*Grupo-6 (Vacinado com proteínas ATCC 19636 expressas sob restrição de ferro/Provocado com 1477 Bovina)

15 *Grupo-7 (Vacinado com FeCl₃ 1477 Bovina/Provocado com 1477 Bovina)

Quando comparando os camundongos provocados com isolato de 1477 bovina, apenas 20% dos camundongos no grupo vacinado com placebo (Grupo 3) morreram dentro de 7 dias de provocação. No entanto, provocação com o isolato de 1477 bovina elicitou o desenvolvimento de lesões

de pele necróticas em 6 (76%) dos camundongos sobreviventes do Grupo 3. Essas lesões foram medidas e o tamanho médio das lesões nos camundongos sobreviventes foi 18,5 mm (Tabela 9). Em contraste, 20% dos camundongos do Grupo 4 morreram dentro de 7 dias de provocação, mas apenas
5 três (38%) dos camundongos sobreviventes desenvolveram lesões (diâmetro médio, 2,7 mm). Esses resultados indicam que a composição de 1477 bovina ofereceu proteção homóloga significativa contra desenvolvimento de lesões nos camundongos provocados com a linhagem bovina 1477 ($p=0,009$, teste t de student). Ainda, vacinação com a composição de ATCC 19636
10 protegeu contra provocação com a linhagem 1477, uma vez que nenhum camundongo morreu no Grupo 6 e apenas três (30%) dos camundongos desenvolveram lesões de pele (diâmetro médio, 3,7 mm). Juntos, mortalidade e/ou desenvolvimento de lesão reduzidos nos camundongos nos Grupos 5 e 6 demonstraram a natureza de proteção cruzada significativa das composições derivadas das linhagens 19636 e 1477 ($p=0,012$, teste t de student
15 com base em tamanho de lesão). Na demonstração da eficácia da composição comparado com as proteínas não-reguladas por ferro, 20% dos camundongos no Grupo 7 morreram e 4 dos sobreviventes desenvolveram lesões de pele (diâmetro médio, 15,8 mm). Os camundongos do Grupo 7 demonstraram algum grau de proteção pela vacinação com as proteínas do isolato
20 1477 uma vez que menos camundongos desenvolveram lesões comparado com o Grupo 3 de vacina com placebo. No entanto, as lesões de pele observadas nos camundongos no Grupo 7 foram mais frequentes e de um diâmetro maior do que as lesões nos camundongos do grupo 4, indicando que, com relação a proteínas isoladas de células cultivadas sob condições com
25 ferro, as proteínas isoladas das bactérias cultivadas sob restrição de ferro ofereceram proteção superior contra uma provocação idêntica.

A natureza de proteção cruzada das proteínas observadas no estudo de provocação de camundongo é apoiada pelos pesos moleculares
30 similares das proteínas das linhagens de *S. aureus* descritas no Exemplo 1 (Figura 1). Embora tenha havido diferenças notáveis no perfil de SDS-PAGE das proteínas dos isolatos derivados de bovino, especificamente a ausência

de uma proteína de 38,4 kDa e a presença de 3 proteínas adicionais, as proteínas de ambas as linhagens 1477 e ATCC 19636 elicitaram proteção heteróloga. Esses resultados indicam que as proteínas similares entre as linhagens 19636 e 1477 são provavelmente responsáveis pela proteção cruzada observada nos Grupos 5 e 6. Em contraste, os perfis de proteína da linhagem 1477 cultivada sob condições isentas de ferro e com ferro são observavelmente diferentes. Essas proteínas isoladas sob condições sem ferro são mais protetoras quando comparado com as proteínas isoladas sob condições com ferro, demonstrado pela redução em desenvolvimento de lesão dentre os camundongos do Grupo 4 comparado com os camundongos do Grupo 7.

Tabela 9. A indução de Lesões Necróticas em Camundongos Sete Dias Pós-provação com *Staphylococcus aureus* (Isolato ATCC 19636 e/ou Isolato Bovino 1477)

Diâmetro da lesão (milímetro) por camundongo						
Grupo-1	Grupo-2	Grupo-3	Grupo-4	Grupo-5	Grupo-6	Grupo-7
Nenhuma lesão	Nenhuma lesão	26	5	5	5	25
Nenhuma lesão	Nenhuma lesão	25	2	Nenhuma lesão	5	25
Nenhuma lesão	Nenhuma lesão	24	1	Nenhuma lesão	1	10
Morto	Nenhuma lesão	24	Nenhuma lesão	Nenhuma lesão	Nenhuma lesão	3
Morto	Nenhuma lesão	7	Nenhuma lesão	Nenhuma lesão	Nenhuma lesão	Nenhuma lesão
Morto	Nenhuma lesão	5	Nenhuma lesão	Nenhuma lesão	Nenhuma lesão	Nenhuma lesão
Morto	Nenhuma lesão					
Morto	Nenhuma lesão					
Morto	Nenhuma lesão	Morto	Nenhuma lesão	Morto	Nenhuma lesão	Morto
Morto	Morto	Morto	Morto	Morto	Nenhuma lesão	Morto
Diâmetro de lesão médio (mm) dentre camundongos sobreviventes						
0	0	18,5	2,7	5	3,7	15,8

*Grupo-1, (Vacinado com placebo/Provocado com ATCC 19636)

*Grupo-2 (Vacinado com proteínas ATCC 19636 expressas sob restrição de ferro/Provocado com ATCC 19636)

*Grupo-3 (Vacinado com placebo/Provocado com 1477 Bovina)

*Grupo 4 (Vacinado com proteínas 1477 Bovinas expressas sob restrição de ferro/Provocado com 1477 Bovina)

*Grupo-5 (Vacinado com proteínas 1477 Bovinas expressas sob restrição de ferro/Provocado com ATCC 19636)

*Grupo-6 (Vacinado com proteínas ATCC 19636 expressas sob restrição de ferro/Provocado com 1477 Bovina)

*Grupo-7 (Vacinado com FeCl₃ 1477 Bovina/Provocado com 1477 Bovina)

Exemplo 6

Em mamíferos, foi mostrado que a resposta à lesão em tecido ou infecção bacteriana resulta em uma resposta inflamatória aguda. Esta resposta aumenta a permeabilidade capilar e a infiltração fagocítica resultando nos sinais clínicos reconhecidos como inflamação; inchaço, febre, dor e vermelhidão; se deixado sem controle, isso pode levar à morte. A ativação de fatores humorais e a liberação de citocinas fazem a mediação de eventos sistêmicos coletivamente conhecidos como a resposta de proteína de fase aguda que resulta em uma cascata de eventos fisiológicos e bioquímicos. A duração desta resposta está diretamente relacionada com a severidade da lesão e magnitude da infecção sistêmica. Foi bem documentado que durante a sepse bacteriana, cirurgia grande, queimaduras e outros traumas corporais há uma alteração na concentração de vários íons de metal no soro tais como ferro, cobre e zinco. Por exemplo, durante a fase aguda de uma infecção há uma diminuição nos níveis de ferro e zinco no plasma e um aumento em cobre. A alteração desses íons de metal traços no soro pode afetar diretamente a severidade ou progressão de qualquer infecção bacteriana.

Neste estudo a requerente examinou a expressão de proteínas de *Staphylococcus aureus* sob várias condições de restrição de íon de metal a fim de imitar a expressão de novas proteínas que podem ser expressas durante a invasão sistêmica. As linhagens de *Staphylococcus aureus* avaliadas neste estudo se originaram de amostras clínicas de três espécies diferentes de animal; ave (linhagem SAAV1), humano (linhagem 19636) e bovino (linhagens 1477 e 2176). Em suma, culturas de cada isolato foram preparadas a partir de estoques de semente máster em 200 ml de Caldo de Soja Trípico (TSB). Cada cultura foi cultivada enquanto agitando a 200 rpm por 6 horas a 37° C. Dez ml de cada cultura foram transferidos para 500 ml de TSB isento contendo um a quatro quelantes de íon de metal; 2,2-dipiridinila (Dp), 2-piridilmetil-etileno diamina (TPEN), catequina e naringeninas (todos obtidos da Sigma, St. Louis, MO). Ainda, cada cultura foi também cultivada em meios com cátion contendo cloreto férrico, cloreto de zinco e/ou cloreto de cobre preparados em concentrações de 300 µM. Os quelantes de íon de

metal foram usados na concentração que segue: 2,2-dipiridila (800 μM), catequina e naringenina foram usadas a 300 μM e 2-piridilmetil-etileno diamina foi usada em uma concentração de 100 μM . As culturas foram cultivadas com cada quelante por 8 horas, ponto onde a cultura foi subculturada uma
5 segunda vez por mais 12 horas. Cada cultura foi subculturada por três passagens consecutivas em intervalos de 12 horas. No final da terceira passagem, cada cultura foi coletada através de centrifugação a 10.000 x g por 20 minutos. Cada cultura foi lavada duas vezes através de centrifugação a 10.000 x g e ressuspensa em 20 ml de solução salina tamponada com Tris,
10 pH 7,2 a 4° C.

Cada pélete bacteriano foi ressuspensa em 45 ml de solução salina tamponada com Tris, pH 7,2 (Tris 25 mM e NaCl 150 mM) e as suspensões bacterianas resultantes foram despejadas como alíquotas de 9 ml em 5 tubos individuais, vinte tubos no total. Um milímetro de TBS contendo 50
15 unidades de lisostafina (Sigma, St. Louis, MO) foi adicionado a cada tubo para dar uma concentração final de 5 unidades/ml. Seguindo incubação a 37° C por 30 minutos enquanto agitando a 200 rpm, 1 ml de TBS contendo 0,1 mg de lisozima (Sigma) foi adicionado a cada tubo. As suspensões bacterianas foram então incubadas por mais 45 minutos enquanto agitando a
20 200 rpm. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 3050 x g por 12 minutos a 4° C para peletizar restos celulares grandes. Os sobrenadantes foram coletados através de aspiração sem perturbar o pélete. O sobrenadante foi então centrifugado a 39.000 x g por 2,5 horas. Os péletes resultantes, enriquecidos em proteínas de membrana reguladas por metal, foram ressus-
25 pensos em 200 μL de tampão Tris, pH 7,2. As soluções de proteína para cada isolato foram combinadas para um volume total de 1 ml e armazenadas a -90° C.

As proteínas obtidas dos isolatos de *S. aureus* SAAV1, 19636, 1477 e 2176 cultivadas sob condições isentas de ferro, zinco e cobre incluí-
30 am polipeptídeos regulados por metal.

Extratos celulares, derivados de cada isolato, foram fracionados em tamanho em géis SDS-PAGE usando um gel de empilhamento 4% e gel

de separação 10%. Amostras para eletroforese foram preparadas combinando 10 µg de amostra com 30 µl de tampão de amostra de redução SDS (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, glicerol 20%, SDS 2%, beta-mercaptoetanol 5%) fervidos por 4 minutos. As amostras sofreram eletroforese em corrente constante de 18 mA por 5 horas a 4° C usando um fornecimento de energia de célula xi Protein II (BioRad Laboratories, Richmond, CA, modelo 1000/500).

Os padrões de SDS-PAGE das proteínas cultivadas sob quelação com zinco e/ou cobre mostraram padrões de formação de faixa únicos em todos os isolados que eram diferentes quando comparado com os mesmos isolatos cultivados sob restrição de ferro na presença de 2,2'-dipiridila. Por exemplo, quando o isolato 19636 foi cultivado sob restrição de ferro ou na presença do quelante 2,2'-dipiridila, proteínas reguladas por ferro únicas foram expressas nas regiões de 87,73 kDa, 54,53 kDa, 38,42 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa e 33,0 kDa. Essas proteínas foram subreguladas quando o isolato foi cultivado na presença de cloreto férrico. No entanto, quando o mesmo isolato foi cultivado na presença do quelante de zinco e/ou cobre, um novo subconjunto de proteínas foi expresso com relação às proteínas expressas sob restrição de ferro; as novas proteínas tendo pesos moleculares de aproximadamente 115 kDa, 88 kDa, 80 kDa, 71 kDa, 69 kDa, 35 kDa, 30 kDa, 29 kDa e 27 kDa. Ainda, uma proteína de 87,73 kDa foi expressa sob condições de restrição de ferro ou restrição de cobre, mas não quando as culturas eram restritas em zinco. As proteínas expressas sob restrição de ferro pareciam ser subreguladas quando cultivadas sob ou restrição de zinco e/ou restrição de cobre, mas não completamente inativadas conforme visto quando o isolato foi cultivado em cloreto férrico.

Parece que há novas proteínas expressas quando o organismo é cultivado sob restrição de cobre e/ou restrição de ferro que não são expressas quando o mesmo isolado é cultivado sob condições restritas em ferro. Uma vez que metais de transição são usados por organismos para formar enzimas que catalisam várias reações bioquímicas, os íons de metal podem desempenhar um papel vital em sobrevivência microbiana durante uma infecção sistêmica. Talvez seja por essa razão que durante sepsé há

uma diminuição transiente na disponibilidade desses metais transicionais, tornando-os indisponíveis para cultivo do organismo. Essas novas proteínas poderiam aumentar muito bem a eficácia de proteção da composição existente cultivada sob restrição de ferro porque elas podem também ser expressas pelas bactérias sob a restrição de íon de metal sofrida durante invasão sistêmica.

Exemplo 7

As composições da presente invenção podem também ser produzidas sob condições comerciais de grande escala

10 Fermentação

Um frasco criogênico da semente de trabalho (2 ml a 10^9 CFU/ml) conforme descrito no Exemplo 1 foi usado para inocular 500 ml de Caldo de Soja Tríptico (TSB) sem dextrose (Difco) preaquecido para 37° C contendo 0,125 g/l de 2,2-dipiridila (Sigma), 2,7 gramas de extrato de levedura BiTek (Difco) e glicerol (3% vol/vol). A cultura foi incubada a 37° C por 12 horas enquanto agitando a 200 rpm momento quando ela foi usada para inocular 2 litros do meio acima e deixada crescer por mais 4 horas a 37° C. Esta cultura foi usada para inocular um fermentador de bancada VIRTIS de 20 litros (Virtis, Gardiner, NY) carregado com 13 litros do meio descrito acima. O pH foi mantido constante entre 6,9 e 7,1 através de titulação automática com NaOH 50% e HCl 10%. A velocidade de agitação foi ajustada a 400 rev/minuto e a cultura aerada com 11 litros ar/minuto a 37° C. Espumação foi controlada automaticamente através da adição de 11 ml de desespumante (Mazu DF 204 Chem/Serv, Mineápolis, MN). A cultura foi deixada crescer continuamente nessas condições por 4 horas momento quando foi esterilmente bombeada em um fermentador de 150 litros (W.B. Moore, Easton, PA). O fermentador foi carregado com 120 litros de caldo de soja tríptico sem dextrose (3.600,0 gramas), extrato de levedura BiTek (600 gramas), glicerol (3.600 ml), 2,2-dipiridila (3,0 gramas) e desespumante Mazu DF 204 (60 ml). Os parâmetros da fermentação eram como segue: oxigênio dissolvido (DO) (*Dissolved Oxygen*) foi mantido a 30% +/- 10% através do aumento da agitação para 220 rev/min aspergido com 60 litros de ar/minuto e 68,94

Kpa (10 libras por polegada quadrada (psi)) de pressão contrária. O pH foi mantido constante entre 6,9 e 7,1 através de titulação automática com NaOH 50% e HCl 10% e a temperatura mantida a 37° C. Na hora 4,5 (OD₅₄₀ 8-9) da fermentação a cultura foi transferida para um fermentador New Brunswick Scientific de 1.500 litros IF-15000 carregado com 1200 litros de caldo de soja triptico sem dextrose (36.000 gramas), extrato de levedura BiTek (6.000 gramas), glicerol (36.000 ml), 2,2-dipiridila (30,0 gramas) e desespumante Mazu DF 204 (600 ml). Os parâmetros da fermentação foram como segue:

5

10

15

oxigênio dissolvido (DO) foi mantido a 60% +/- 10% com oxigênio suplementar através do aumento da agitação para 300 rev/min aspergido com 300 a 1100 litros de ar/minuto e 34,473 Kpa (5 libras por polegada quadrada (psi)) de pressão contrária. Conforme a fermentação progredia, oxigênio suplementar foi adicionado de 0-90 litros/minuto para auxiliar no controle de oxigênio dissolvido. O pH foi mantido constante entre 6,9 e 7,4 através de titulação automática com NaOH 50% e HCl 10% e a temperatura foi mantida a 37° C.

Aproximadamente 5 horas pós-inoculação do fermentador grande, a cultura foi suplementada com nutrientes adicionais através da alimentação de 70 litros de meio contendo 18.000 gramas de TSB sem dextrose,

20

3.000 gramas de extrato de levedura, 30,0 gramas de 2,2-dipiridila e 18.000 ml de glicerol. A taxa de alimentação foi ajustada para aproximadamente 28 litros/hora enquanto aumentando a agitação. No final da alimentação a fermentação foi deixada continuar por mais 4 horas, ponto onde a fermentação foi terminada através da diminuição da temperatura do fermentador para 18°

25

C (OC₅₄₀ 35-40 em uma diluição 1:100).

Coleta

A fermentação bacteriana foi concentrada e lavada usando um Pall Filtron Tangential Flow Maxiset-25 (Pall Filtron Corporation, Northboro, MA) equipado com três filtros de canal aberto Alpha 300-K de 30 pés², No.

30

de catálogo AS300C5; (Pall Filtron) conectado a uma bomba de alimentação Waukesha Modelo U-60 (Waukesha Cherry-Burrell, Delevan, WI). O volume de cultura original de 1250 litros foi reduzido para 50 litros (2,5 litros/minuto)

usando uma pressão de entrada de filtro de 206,84 Kpa (30 psi) e uma pressão de retentato de 34,473 - 41,368 Kpa (5-6 psi). O retentato bacteriano foi ajustado de volta para 150 litros usando Solução Salina Tamponada com Tris, pH 8,5, e então concentrado novamente para 50 litros para ajudar a
5 remover quaisquer proteínas exógenas contaminantes, tais como exoproteínas, para incluir toxinas e proteases secretadas. O pH elevado da solução salina tamponada com tris ajuda a prevenir muito da degradação proteolítica que pode ocorrer durante armazenamento da suspensão de célula integral. Inibidores de protease podem ser usados ao invés de, ou em adição a, um
10 pH elevado. O retentato foi misturado completamente enquanto no tanque de 200 litros usando um misturador magneticamente acionado de montagem frontal. O retentato foi esterilmente despejado (3,5 litros) em recipientes Nalgene de 4 litros estéreis No. 2122 e posto em um freezer a -20° C para armazenamento como um ponto de ruptura na fabricação, ou poderia ser pro-
15 cessado mais. A massa do pélete foi calculada através de centrifugação de amostras de 30 ml da cultura fermentada e coleta final. Em suma, tubos cônicos Nalgene de 50 ml pré-pesados foram centrifugados a 39.000 x g por 90 minutos em uma centrífuga Beckman J2-21 usando um rotor JA-21 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). No final da atividade, o sobrenadante
20 foi jogado fora e os tubos foram pesados novamente. A massa do pélete foi calculada para cada estágio. O processo de fermentação rendeu uma massa de pélete úmida de aproximadamente 60 quilogramas.

Rompimento

Oitenta quilogramas de pasta fluida de célula bacteriana em So-
25 lução Salina Tamponada com Tris, pH 8,5, foram assepticamente transferidos para um tanque de processo revestido de 1000 litros de vapor local (Lee, Modelo 259LU) com um misturador montado na parte superior (Eastern, Modelo TME-1/2, EMI Incorporated, Clinton, CT) contendo 900 litros de TBS pH 8,5. A suspensão bacteriana bruta foi esfriada para 4° C com mistu-
30 ra contínua por 18 horas a 200 rpm momento quando foi rompida através de homogeneização. Em suma, o tanque de 1000 litros contendo a suspensão bacteriana foi conectado a um homogeneizador AVESTIN modelo C-500-B

(Avestin Inc., Ottawa, Canadá). Um segundo tanque de processo revestido de 1000 litros (vazio) foi conectado ao homogeneizador de maneira que o fluido no tanque de processo pudesse ser passado pelo homogeneizador, para o tanque vazio e de volta novamente permitindo passagens de homogeneização múltiplas enquanto ainda mantendo um sistema fechado. A temperatura durante a homogeneização foi mantida a 4° C. No início da primeira passagem, fluido foi circulado a 482,63 Kpa (70 psi) através de uma bomba Waukesha modelo 10DO (Waukesha) através do homogeneizador (500 galões/hora), enquanto a pressão do homogeneizador era ajustada para 206,84 Mpa (30.000 psi). Antes da primeira passagem, duas amostras de pré-homogeneização foram retiradas do homogeneizador para estabelecer uma linha de base para determinação do grau de rompimento e monitoramento do pH. O grau de rompimento foi monitorado através de transmitância (%T a 540 nm em diluição 1:100) comparado com a amostra não-homogeneizada. O número de passagens pelo homogeneizador foi padronizado para dar uma transmitância percentual final entre 78-91%T em uma diluição 1:100 preferivelmente entre 86-91%). Após homogeneização, o tanque foi removido do homogeneizador e posto em uma alça resfriadora a 4° C e misturado a 240 rpm.

20 Coleta de Proteína

A suspensão bacteriana rompida contendo as proteínas reguladas por ferro conforme ilustrado na Figura 1 foi coletada através de centrifugação usando T-1 Sharples, (Alfa Laval Separations, Warminster, PA). Em suma, o tanque de processo revestido de 1000 litros contendo homogenato bacteriano rompido foi alimentado em 12 Sharples com uma taxa de alimentação de 250 ml/minuto a 117,21 Kpa (17 psi) em uma força centrífuga de 60.000 x g. O efluente foi coletado em um segundo tanque de processo revestido de 1000 litros através de uma alça estéril fechada permitindo passagens múltiplas através das centrífugas enquanto mantendo um sistema fechado. A temperatura durante a centrifugação foi mantida a 4° C. O homogenato foi passado 8 vezes através das centrífugas. Aproximadamente 50% da proteína foram coletados após a segunda passagem, ponto onde o fluido

homogenato foi concentrado para 1/3 de seu volume original, o que diminuiu o tempo de processo para as próximas 6 passagens. O tanque de homogenato foi assepticamente desconectado das centrífugas e conectado a uma montagem Millipore Pellicon Tangential Flow Filter (Millipore Corporation, Bedford, MA) equipada com um filtro Centrasette série Alpha 30K de canal de tela de 25 pés² (Pall Filtron) conectado a uma bomba de alimentação Waukesha Modelo U30 para concentração. Após concentração, centrifugação foi continuada até que o processo estivesse completo. Proteína foi coletada após cada passagem. A proteína foi coletada, ressuspensa e despejada em 50 litros de solução salina tamponada com Tris, pH 8,5, contendo formu-
lina 0,15% (Sigma) como preservativo.

Diafiltração

A suspensão de proteína foi lavada através de diafiltração a 4° C para remover quaisquer proteínas exógenas (proteases, toxinas, enzimas citoplásmicas e metabólicas, etc). Em suma, os 50 litros de proteína foram esterilmente transferidos para um tanque de processo de 200 litros contendo 150 litros de solução salina tamponada com Tris, pH 8,5, equipado com um misturador Dayton frontal, Modelo 2Z846 (Dayton Electric, Chicago, IL) girando em 125 rev/minuto. O tanque de processo foi esterilmente conectado a uma montagem Millipore Pellicon Tangential Flow Filter (Millipore Corporation) equipado com um filtro Centrasette série Alpha 30K de canal de tela de 25 pés² (Pall Filtron) conectado a uma bomba de alimentação Waukesha Modelo U30. A solução de proteína de 200 litros foi concentrada através de filtração para um volume alvo de 50 litros ponto onde 150 litros de solução salina estéril foram adicionados. A suspensão de proteína foi então concentrada para aproximadamente 50 litros. O concentrado de proteína foi armazenado em um tanque de processo revestido de 50 litros equipado com um misturador montado na parte superior e armazenado a 4° C.

É interessante notar que a composição derivada do processo de larga escala usando homogeneização como um meio de rompimento gerou perfis de formação de faixa idênticos conforme examinado através de SDS-PAGE comparado com o processo em escala menor descrito no Exemplo 1.

Esses resultados mostram que lisostafina poderia ser substituída como o agente de lise bacteriana usando homogeneizador AVESTIN C500-B. Esta constatação permite a geração em baixo custo de volumes grandes de proteínas reguladas por ferro de *staphylococci*.

5 Exemplo 8

Hiperimunização de camundongos e preparação de anticorpo policlonal

Imunização passiva com anticorpo purificado isolado de camundongos vacinados com proteínas derivadas de *S. aureus* linhagem ATCC 19636 cultivadas sob condições limitantes de ferro era protetora contra pro-
10 vocações por *S. aureus* homóloga e heteróloga. Quinze camundongos adultos CD1 foram vacinados conforme descrito no Exemplo 3 com a composição de proteína derivada de *S. aureus* linhagem ATCC 19636 cultivada sob
15 condições isentas de ferro conforme descrito nos Exemplos 1 e 2. Os camundongos foram vacinados intraperitonealmente 3 vezes em intervalos de 7 dias com 50 µg de composição de proteína em cada vacinação. Sete dias
após a terceira imunização, os camundongos sofreram sangria completa através de punção cardíaca. Soro foi agrupado e anticorpo purificado usando precipitação com sulfato de amônio padrão. Proteínas do soro exógenas fo-
ram removidas primeiro antes da precipitação do anticorpo através da adição
20 de 0,5 volume de sulfato de amônio saturado pH 7,2. A solução foi agitada a 100 rpm por 24 horas a 4° C. A solução foi novamente centrifugada a 3000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e precipitado novamente a-
través da adição de sulfato de amônio saturado suficiente para trazer a con-
centração final para 55% de saturação. A solução foi agitada a 100 rpm por
25 24 horas a 4° C. O precipitado foi centrifugado a 3000 x g por 30 minutos. O pélete final de cada amostra foi ressuspenso em 2 ml de PBS, pH 7,2. Os anticorpos precipitados foram então dialisados usando uma tubulação de
diálise de corte molecular de 50.000 (Pierce, Rockford, IL) por 30 horas con-
tra três mudanças de 1 litro de solução salina tamponada com fosfato para
30 remover sulfato de amônio. As duas primeiras mudanças de litro foram pre-
servadas com azida de sódio 0,02%. A mudança de tampão de 1 litro final
não continha nenhum preservativo. O dialisato foi coletado e centrifugado

novamente para remover quaisquer restos remanescentes a 3000 x g por 30 minutos. A solução de anticorpo foi armazenada a 4° C por menos de 48 horas antes do uso. Cada amostra foi plaqueada em ágar de sangue para verificar a esterilidade antes da infusão.

5 Exemplo 9

Imunização passiva e provocação

A fim de avaliar o efeito protetor de anticorpo infundido criado contra proteínas *S. aureus* expressas durante limitação de ferro, dois grupos de 15 camundongos foram, cada um, infundidos intraperitonealmente ou com a preparação de anticorpo purificada (Grupo 1) ou solução salina fisiológica (Grupo 2) em uma infusão de 200 µL. Dois grupos adicionais de 15 camundongos foram infundidos subcutaneamente ou com preparação de anticorpo purificada (Grupo 3) ou solução salina fisiológica (Grupo 4). Após 60 minutos, os 2 grupos de 15 camundongos recebendo uma infusão intraperitoneal foram provocados intraperitonealmente com $1,3 \times 10^8$ cfu de *S. aureus* linhagem 19636. Similarmente, os 2 grupos de 15 camundongos recebendo uma infusão subcutânea foram provocados subcutaneamente com $1,3 \times 10^8$ cfu de *S. aureus* linhagem 1477 para teste quanto à proteção cruzada contra provocação por uma linhagem de *S. aureus* diferente. Mortalidade e/ou tamanho da lesão foi registrado por 5 dias e os fígados de todos os camundongos foram removidos *post-mortem*, homogeneizados e plaqueados para determinar o número de *S. aureus* presente como uma medida de infecção sistêmica. As curvas de sobrevivência Kaplan-Meier (Figuras 5 e 6) mostram o efeito de proteção fornecido pela infusão de anticorpos de camundongos vacinados com as proteínas de *S. aureus* expressas durante restrição de ferro. Embora a diferença entre os grupos infundidos e controle para grupos provocados com ATCC 19636 não fosse significativa ($p=0,076$, teste log-rank), o fígado do único camundongo que morreu dentro do grupo infundido com anticorpo no Dia 1 foi cultivado em ágar de sangue para determinar a ausência e/ou a presença do organismo de provocação (*S. aureus*). A cultura derivada deste camundongo era negativa para *Staphylococcus* e não mostrou nenhum desenvolvimento na placa de ágar de sangue ou

meio de cultura. Em contraste, os fígados dos camundongos que morreram dentro do grupo de placebo foram todos positivos para a presença de *Staphylococcus*, na verdade, culturas puras foram obtidas em cada placa de ágar de sangue derivada dos fígados desses camundongos. Apesar dos dados de

5 fígado não precludirem a possibilidade que o camundongo que morreu dentro do grupo infundido com anticorpo morreu de infecção por *S. aureus*, a infecção não foi sistêmica, como foi no grupo de placebo, e o camundongo pode ter morrido por outras razões. Verificação desta morte de camundongo infundido com anticorpo resulta em uma diferença significativa entre trata-

10 mentos infundidos com anticorpo e placebo ($p=0,015$, teste log-rank). Os dados para a provocação cruzada, onde os camundongos foram infundidos com anticorpo gerado após vacinação com proteínas derivadas de ATCC 19636 e provocados por *S. aureus* linhagem 1477, também mostraram uma tendência protetora. Entre 7 e 14 dias pós-provocação, todos os camundon-

15 gos nos grupos infundidos e não-infundidos começaram a desenvolver lesões de pele necróticas. No entanto, exame macroscópico de camundongos claramente revelou um retardo visível na formação de uma lesão observável bem como a severidade da lesão entre os grupos. Camundongos infundidos desenvolveram lesões mais lentamente comparado com camundongos con-

20 trole não-infundidos que desenvolveram lesão mais rápido do que os camundongos infundidos e em um grau de severidade maior. Os camundongos infundidos cicatrizaram mais rápido do que camundongos não-infundidos. Isto era claramente evidente entre 21 e 35 dias pós-provocação. Exame ma-

25 croscópico de camundongos em 35 dias pós-provocação mostrou que camundongos não-infundidos foram seriamente desfigurados e revelou um grau maior de cicatrização. Na realidade, muitos desses camundongos perderam a postura normal, pelo fato de que eles pareciam ter aparência deformada, em contraste com camundongos infundidos que quase não desenvolveram tecido de cicatriz extenso e/ou desfiguramento conforme ilustrado

30 pela aparência deformada que os camundongos não-infundidos desenvolveram. No geral, esses dados sugerem que infusão intraperitoneal de anticorpos criados contra proteínas induzidas por ferro em *S. aureus* pode ambos

proteger contra e limitar a severidade de infecção por *S. aureus*.

Exemplo 10

Varredura de uma composição de vacina derivada de *Staphylococcus aureus* em um rebanho leiteiro cronicamente infectado

5 Um rebanho leiteiro comercial tendo uma história de contagens de célula somática cronicamente altas atribuível à *Staphylococcus aureus* foi escolhido para a varredura de uma composição de vacina conforme descrito no Exemplo 1. O critério para estabelecimento de eficácia da vacina deste estudo experimental foi: 1) incidência menor de mastite clínica causada por

10 *Staphylococcus aureus* dentre controles vacinados comparado com não-vacinados, 2) melhora (isto é, uma diminuição) em contagem de célula somática dentre vacinados comparado com controles e 3) diminuição em taxas de isolamento positivas de cultura de *S. aureus* entre controles vacinados e

15 não-vacinados. Sangue será coletado no momento da primeira vacinação (dia 0) e novamente nas semanas 3 e 6 pós-imunização inicial. Reações de sítio de injeção ou reações sistêmicas seguindo vacinações foram monitoradas durante o estudo. Ainda, amostras de leite de tanque principal foram

20 cultivadas e quantitativamente enumeradas para determinar se houve uma diminuição no número de CFU de *Staphylococcus aureus* cultivada após vacinação.

Três dos isolatos de *Staphylococcus* derivados de vacas leiteiras cronicamente infectadas dentro do rebanho foram cultivados sob condições de restrição de ferro e condições de não-restrição de ferro conforme descrito no Exemplo 1. Os três isolatos foram designados TTX101, TTX102 e

25 TTX103. Amostras extraídas foram examinadas através de SDS-PAGE para comparar perfis de formação de faixa entre isolatos. Perfis de formação de faixa idênticos foram observados dentre os isolatos examinados; as composições feitas a partir de cada isolato incluíam proteínas tendo pesos moleculares de 87,73 kDa, 80,46 kDa, 65,08 kDa, 54,53 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa,

30 34,91 kDa, 33,0 kDa e 31,83 kDa. Essas proteínas são dos mesmos pesos moleculares que anteriormente descrito na Tabela 7. Ainda, quando comparando os isolatos perfis de formação de faixa idênticos foram vistos com a-

quelas proteínas que eram expressas em todas as condições que não eram reguladas por ferro: 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58, kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa e 40 kDa. Esses resultados estavam de acordo com as observações anteriores. Um isolato designado TTX101 foi escolhido como o isolato para fabricação de uma composição a ser usada neste estudo.

Exemplo 11

Preparação de vacina de *Staphylococcus aureus* (TTX101)

Uma composição foi preparada conforme descrito no Exemplo 1 usando o isolato TTX101. A composição incluía proteínas expressas sob condições isentas de ferro tendo pesos moleculares de 87,73 kDa, 80,46 kDa, 65,08 kDa, 54,53 kDa, 37,37 kDa, 35,70 kDa, 34,91 kDa, 33,0 kDa e 31,83 kDa bem como proteínas não-reguladas por metal tendo pesos moleculares de 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa e 40 kDa. A composição de imunização derivada da linhagem TTX101 foi usada para preparar a vacina experimental através da emulsificação da suspensão de proteína extraída (400 µg de proteína total por mililitro) em um adjuvante comercial (EMULSIGEN, MVP Laboratories, Ralston NE) usando um recipiente de homogeneização T50 Ultra Turrax IKA (IKA, Cincinnati, OH) para dar uma dose final de 800 µg de proteína total em um volume injetável de 2,0 ml com uma concentração de adjuvante de 22,5% vol/vol. A vacina foi administrada subcutaneamente 2 vezes em intervalos de 21 dias.

Exemplo 12

Projeto experimental e vacinação do rebanho

Dezoito dias antes da primeira vacinação todas as vacas leiteiras inscritas no estudo (N=80) foram testadas quanto à *S. aureus* através de métodos de cultura bacteriológica aeróbica padronizada através da cultura de amostras de leite individuais derivadas de cada vaca leiteira. Ainda, as Contagens de Célula Somática (SCC) foram enumeradas pela *Dairy Herd Improvement Association* usando métodos padrão. Quatorze de 80 vacas foram clinicamente diagnosticadas com mastite e foram culturadas positivas para *S. aureus*. As vacas restantes (N=66) testaram negativas para *S. au-*

reus. As oitenta vacas foram igualmente divididas em dois grupos designados grupo-1, vacinado (N=40), e grupo-2, não-vacinado (N=40). As quatorze vacas positivas para *Staphylococcus* clinicamente diagnosticadas foram igualmente distribuídas entre ambos os grupos de maneira que cada grupo de estudo contivesse 7 vacas com mastite clínica. A SCC média entre grupos antes da primeira vacinação foi 203,219 nos controles não-vacinados comparado com 240,443 em vacinados (não estatisticamente diferentes $p=0,7$).

Dezoito dias após a primeira amostragem todas as vacas no grupo 1 foram vacinadas subcutaneamente na espádua superior direita com 2 ml de vacina conforme descrito no Exemplo 11. Dez dias após a primeira vacinação, amostras de leite foram obtidas neste período de tempo através do DHIA para a enumeração de células somáticas de cada vaca individual. Amostras de leite não foram bacteriologicamente testadas neste mesmo período de tempo para determinação da presença de *Staphylococcus*. A diferença na SSC entre os grupos neste período de tempo foi 125,241 (vacinados) comparado com 196,297 (controles). Isto era uma diferença de 36% no número de células somáticas entre os controles vacinados comparado com os não-vacinados. A diferença na SCC entre os controles e vacinados neste período de amostragem não foi estatisticamente diferente ($p=0,5$). A falta de diferença estatística na SCC entre os grupos em ambos os períodos de amostragem foi devido à grande variação em SCC individual entre as vacas. O sítio de injeção de cada vaca vacinada foi também examinado neste mesmo período de tempo. Nenhuma das vacas examinadas mostrou qualquer reação de tecido adversa no sítio de injeção através de exame físico. Ainda, não houve nenhuma perda mensurável em produção de leite devido à vacinação.

Vinte e um dias após a primeira vacinação todas as vacas no grupo-1 (vacinadas) receberam sua segunda vacinação ou reforço. Durante o período de tempo entre a primeira vacinação e a segunda vacinação, vacas em ambos os grupos (vacinadas e controle) desenvolveram dano à teta devido a uma queda drástica na temperatura ambiental resultando na forma-

ção de lesões no final do teste, resultando no desenvolvimento de tetas infectadas e potencialmente aumentando o isolamento de *Staphylococcus* durante amostragem, o que foi observado no terceiro período de amostragem. Vinte e três dias após a segunda vacinação amostras de leite foram obtidas

5 através do DHIA para a enumeração de Células Somáticas de cada vaca individual. Amostras de leite foram também bacteriologicamente testadas quanto à presença de *Staphylococcus aureus*. Houve um aumento drástico em taxa de isolamento de *S. aureus* neste período de tempo nas vacas que testaram negativas no primeiro período de amostragem. Nos controles não-

10 vacinados, 42,9% dessas vacas agora testaram positivas para *S. aureus*, em contraste com as vacinadas, o que apenas mostrou um aumento de 35,5%. Isto foi uma diferença de 7,4% entre vacinados conforme comparado com os controles não-vacinados. É difícil dizer que a melhora na taxa de isolamento de *S. aureus* no grupo vacinado foi devido ao efeito da vacina sozinha. Uma

15 pessoa não pode ignorar a dificuldade em obtenção de amostras de leite limpas de vacas que tinham dano à teta, o que poderia aumentar a contaminação potencial do leite por *S. aureus* quando obtendo a amostra. Não obstante, havia uma diferença significativa na SCC média entre vacinados comparado com controles. A SCC média do grupo vacinado era 222.679 com-

20 parado com 404.278 células somáticas conforme medido no grupo controle. Isso foi uma diferença de 44,9% entre vacinados quando comparado com os controles não-vacinados. É interessante especular que a diferença vista na SCC entre esses grupos também coincide com a diferença na taxa de isolamento de *S. aureus* entre os grupos. No entanto, devido à grande variação

25 em SCC entre animais individuais e o tamanho de amostra pequeno do teste experimental no número de animais a diferença não foi estatisticamente diferente ($p=0,28$).

Neste mesmo período de tempo o sítio de injeção de cada vaca vacinada foi examinado quanto a qualquer reação de tecido adversa que

30 pudesse ter sido causada pela composição de vacina. Nenhuma das vacas examinadas mostrou qualquer reação adversa no sítio de injeção através de exame físico. As composições de vacina pareciam ser altamente compati-

veis com tecido e não causaram nenhuma perda mensurável em produção de leite após cada vacinação.

Monitoramento das vacas é continuado através da medição de SSC e amostras de leite quanto à presença ou ausência de *Staphylococcus aureus*. Algumas das vacas de cada grupo são vacinadas uma terceira vez em 42 dias após a segunda vacinação. Parece haver uma diferença favorecendo o uso da composição de vacina para diminuição de contagens de célula somática e controle de infecção causada por *Staphylococcus aureus*. Monitoramento adicional inclui sorologia com base em títulos de anticorpo para a composição vacinada, mudanças em produção de leite em vacas vacinadas devido à melhora na saúde e SCC menor dos animais vacinados comparado com coortes não-vacinados. Ainda, outros experimentos são conduzidos para investigar o índice de proteção da vacina com base em resposta de dose seguindo provocação com uma *S. aureus* virulenta.

15 Exemplo 13

Uma vez que pesos moleculares das proteínas dentre as linhagens de *S. aureus* diferentes foram demonstrados ser similares e uma vez que proteção heteróloga foi observada no estudo de provocação de camundongo, a requerente procurou observar se as proteínas compartilhando pesos moleculares similares na Figura 1 eram proteínas similares. A técnica escolhida para caracterizar as proteínas era espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI-MS). Uma porção da composição foi dissolvida usando SDS-PAGE conforme descrito no Exemplo 1 e o gel foi tingido com Coomassie Brilliant blue para visualizar as proteínas.

25 Materiais e Métodos

Excisão e lavagem. O gel foi lavado por 10 minutos com água duas vezes. Cada faixa de proteína de interesse foi excisada cortando o mais próximo da faixa da proteína para reduzir a quantidade de gel presente na amostra.

30 Cada fatia de gel foi cortada em cubos de 1x1 mm e posta em tubo de 1,5 ml. Os pedaços de gel foram lavados com água por 15 minutos.

Todos os volumes de solvente usados nas etapas de lavagem eram aproximadamente iguais a duas vezes o volume da fatia de gel. A fatia de gel foi em seguida lavada com água/acetonitrila (1:1) por 15 minutos. Quando as proteínas foram tingidas com prata, a mistura de água/acetonitrila foi removida, os pedaços de gel secos em um concentrador/secador a vácuo SPE-EDVAC (ThermoSavant, Holbrook, NY) e então reduzidos e alquilados conforme descrito abaixo. Quando os pedaços de gel não foram tingidos com prata, a mistura de água/acetonitrila foi removida e acetonitrila foi adicionada para cobrir até que os pedaços de gel ficassem um branco pegajoso, momento quando a acetonitrila foi removida. Os pedaços de gel foram reidratados em NH_4HCO_3 100 mM e após 5 minutos, um volume de acetonitrila igual a duas vezes o volume dos pedaços de gel foi adicionado. Isto foi incubado por 15 minutos, o líquido removido e o pedaços de gel secos em um SPE-EDVAC.

15 Redução e alquilação. Os pedaços de gel secos foram reidratados em DTT 10 mM e NH_4HCO_3 100 mM e incubados por 45 minutos a 56° C. Após permitir que os tubos esfriassem para temperatura ambiente, o líquido foi removido e o mesmo volume de uma mistura de iodoacetamida 55 mM e NH_4HCO_3 100 mM foi imediatamente adicionado. Isto foi incubado por 20 30 minutos em temperatura ambiente no escuro. O líquido foi removido, acetonitrila foi adicionada para cobrir até que os pedaços de gel ficassem um branco pegajoso, momento quando a acetonitrila foi removida. Os pedaços de gel foram reidratados em NH_4HCO_3 100 mM e, após 5 minutos, um volume de acetonitrila igual a duas vezes o volume de pedaços de gel foi adicionado. Isto foi incubado por 5 minutos, o líquido removido e os pedaços de 25 gel secos em um Speed vac. Se o gel fosse tingido com coomassie blue, e coomassie residual ainda permanecesse, a lavagem com NH_4HCO_3 100 mM/acetonitrila seria repetida.

30 Digestão In-gel. Pedaços de gel foram completamente secos em um Speed Vac. Os pedaços foram reidratados em tampão de digestão (NH_4HCO_3 50 mM, CaCl_2 5 mM, 12,5 nanogramas por microlitro (ng/ μl) tripsina) a 4° C. Tampão suficiente foi adicionado para cobrir os pedaços de gel

e mais foi adicionado conforme necessário. Os pedaços de gel foram incubados em gelo por 45 minutos e o sobrenadante removido e substituído com 5-2 µl do mesmo tampão sem tripsina. Isto foi incubado a 37° C da noite para o dia em uma incubadora a ar.

5 Extração de peptídeos. Um volume suficiente de NH_4HCO_3 25 mM foi adicionado para cobrir os pedaços de gel e incubados por 15 minutos (tipicamente em um sonificador de banho). O mesmo volume de acetonitrila foi adicionado e incubado por 15 minutos (em um sonificador de banho se possível) e o sobrenadante foi recuperado. A extração foi repetida duas vezes, usando ácido fórmico 5% ao invés de NH_4HCO_3 . Um volume suficiente de ácido fórmico 5% foi adicionado para cobrir os pedaços de gel e incubado por 15 minutos (tipicamente em um sonificador de banho). O mesmo volume de acetonitrila foi adicionado e incubado por 15 minutos (tipicamente em um sonificador de banho) e o sobrenadante foi recuperado. Os extratos foram agrupados e DTT 10 mM foi adicionado para uma concentração final de DTT 1 mM. A amostra foi seca em um concentrador/secador a vácuo SPEEDVAC para um volume final de aproximadamente 5 µl.

Dessalinização de peptídeos. As amostras foram dessalinizadas usando pontas de pipeta ZIPTIP (C18, Millipore, Billerica, MA) conforme sugerido pelo fabricante. Em suma, uma amostra foi reconstituída em solução de reconstituição (5:95 acetonitrila: H_2O , 0,1%-0,5% de ácido trifluoracético), centrifugadas e o pH checado para verificar que era menos do que 3. Uma ZIPTIP foi hidratada aspirando 10 µl de solução 1 (50:50 acetonitrila: H_2O , ácido trifluoracético 0,1%) e descartando as alíquotas aspiradas. Isto foi seguido por aspiração de 10 µl da solução 2 (ácido trifluoracético 0,1% em H_2O deionizada) e descarte das alíquotas aspiradas. A amostra foi carregada na ponta através de aspiração de 10 µl da amostra lentamente na ponta, expelimento da mesma no tubo de amostra e repetição disso 5 a 6 vezes. Dez microlitros de solução 2 foram aspirados na ponta, a solução descartada através de expelimento e este processo foi repetido 5-7 vezes para lavar. Os peptídeos foram eluídos através de aspiração de 2,5 µl de solução gelada 3 (60:40, acetonitrila: H_2O , ácido trifluoracético 0,1%), expelimento e então as-

piração novamente da mesma alíquota para dentro e para fora da ponta 3 vezes. Após a solução ter sido expelida da ponta, o tubo é tampado e armazenado em gelo.

Mapeamento de peptídeo espectrométrico de massa. Os peptídeos foram suspensos em 10 μ l a 30 μ l de ácido fórmico 5% e analisados através de MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA). O espectro de massa dos fragmentos de peptídeo foi determinado conforme sugerido pelo fabricante. Em suma, uma amostra contendo os peptídeos resultantes de uma digestão trípica foi examinada com matriz ácido ciano-4-hidroxicinâmico, transferida para um alvo e deixada secar. A amostra seca foi posta no espectrômetro de massa, irradiada e o tempo de voo de cada íon detectado e usado para determinar uma impressão digital de massa de peptídeo para cada proteína presente na composição. Polipeptídeos conhecidos foram usados para padronizar a máquina.

Análise de dados. As massas experimentalmente observadas para os peptídeos em cada espectro de massa foram comparadas com as massas esperadas de proteínas usando o método de pesquisa Peptide Mass Fingerprint da Mascot search engine (Matrix Science Ltd., Londres, RU, e www.matrixscience.com, vide Perkins e outros, *Electrophoresis* 20, 3551-3567 (1999)). Os parâmetros de pesquisa incluíam: banco de dados, MSDB ou NCBI nr; taxonomia, bactérias (eubactérias) ou Firmicutes (bactérias gram-positivas); tipo de pesquisa, impressão digital de massa de peptídeo; enzima, tripsina; modificações fixas, carbamidometila (C) ou nenhum; modificações variáveis, oxidação (M), carbamidometila (C), a combinação, ou nenhum; valores de massa, monoisotópico; massa de proteína, não-restrita; tolerância de massa de peptídeo, entre ± 150 ppm e ± 430 ppm ou ± 1 Da; estado de carga de peptídeo, Mr; clivagens perdidas max, 0 ou 1; número de interrogações, 20.

Resultados

O resultado desta pesquisa foi uma impressão digital de massa para cada proteína presente na composição como é mostrado nas Tabelas 2, 3, 4 e 5.

Exemplo 14

Identificação de famílias de proteína regulada por ferro usando análise de expressão de gene com base em microdisposição de *S. aureus* cultivada sob condições com baixo teor de ferro

- 5 Para análise de microdisposição, as bactérias foram cultivadas em meios quimicamente definidos (CDM) (*Chemically Defined Media*) feitos a partir de soluções de estoque individuais (Tabela 10).

Tabela 10: Meio quimicamente definido (CDM) para *Staphylococcus aureus*

	[Final]	Composição de estoque	Adicionar a 1 L
10	Sais (20X) g/L	g/500 ml	50 ml
	K ₂ HPO ₄ 7	70	
	KH ₂ PO ₄ 2	20	
	Citrato de Na ₃ 1,47	14,7	
15	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1	10	
	Carboidrato (40X) g/L	g/500 ml	25 ml
	Glicose 5	100	
	Vitaminas (1000X) mg/L	mg/100 ml	1 ml
	Tiamina 1	100	
20	Ácido nicotínico 0,5	50	
	Biotina 0,005	diluição*	
	Pantotenato de cálcio 0,25	25	
	Nucleotídeos (100X) mg/L	mg/100 ml*	10 ml
*Dissolver em 100 ml de HCl 2N			
25	Adenina 5	50	
	Guanina 5	50	
	Citosina 5	50	
	Uracila 5	50	
30	Timina 10	200	

Micronutrientes (1000X) μM mg/100 ml estoqueAB* 1 ml

**Fazer estoques A e B, então adicionar 1 ml de cada a 98 ml de ddH₂O para fazer estoque final*

5	(A)		
	CaCl ₂	0,5	735
	H ₃ BO ₃	0,5	309
	CoCl ₂	0,05	118
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,005	62
10	(B)		
	CuSO ₄	0,1	125
	MnSO ₄	0,1	169
	ZnSO ₄	0,05	144

Individual

15	MgSO ₄	100	
	FeSO ₄ ou outro	10-50	

Aminoácidos (200X) mg/L g/100 ml 5 ml

**Autoclave a menos que de outro modo indicado*

Refrigerar

20	Ácido aspártico (0,1 M HCl)	90	1,8
	Prolina	80	1,6
	Alanina	60	1,2
	Histidina	20	0,4
	Valina	80	1,6
25	Arginina	50	1,0
	Serina	30	0,6
	Metionina	3	0,06
	Isoleucina	30	0,6

Filtrado refrigerado no escuro

30	Triptofano	10	0,2
	Tirosina (0,5 M NaOH)	50	1,0

Temperature ambiente

	Ácido glutâmico	100	2,0
--	-----------------	-----	-----

	Leucina	90	1,8
	Fenilalanina	40	0,8
	Glicina	50	1,0
	Treonina	30	0,6
5	Lisina	50	1,0
	Cisteína diariamente fresca	20	0,4

MÉTODO DE FABRICAÇÃO:

Para fabricação de meios isentos de ferro, combinar todas as so-
 10 luções de estoque exceto cátions e micronutrientes e levar para volume a-
 apropriado em frasco volumétrico usando água purificada MilliQ e deixando
 volume de veio suficiente para acomodar adições de cátion. Adicionar 15 g
 de resina CHELEX por 1 L de meio e agitar em temperatura ambiente por
 pelo menos 2 horas. Filtrar a solução em garrafa de vidro tratada com ácido
 15 sulfúrico (10%) usando filtro de garrafa superior de 2 µm. Adicionar soluções
 de estoque de cátion filtradas e armazenar a 4° C no escuro por até 2 sema-
 nas.

Linhagens RF122 (isolada de mastite bovina) e MSA553 de *S.*
aureus (isoladas da síndrome do choque tóxico humano) foram usadas. Am-
 20 bos os isolatos foram espalhados em ágar de caldo de soja tríptico direta-
 mente a partir de estoques de congelador de passagem secundária antes do
 uso em experimentos. CDM continha concentrações de citrato finais aproxi-
 madamente análogas àquelas no leite bovino (5 mM). Para CDM isento de
 ferro, os componentes que seguem foram combinados (volume total de
 25 0,998 L) e adicionados a 15 g de resina CHELEX (BioRad Laboratories, Her-
 cules, CA), então agitados por 1,5 hora em temperatura ambiente: sal, glico-
 se, aminoácidos, vitamina e nucleotídeos. O meio de base sem ferro foi en-
 tão filtrado usando filtros de garrafa superiores de 2 µm (Nalgene Nunc In-
 ternational, Rochester, NY) em garrafas tratadas com ácido sulfúrico, após o
 30 que micronutrientes e MgCl₂ 100 µM (ambas as soluções preparadas em
 vidraria tratada com ácido com água MilliQ) foram adicionados. CDM foi ar-
 mazenado a 4° C no escuro até o uso.

Uma única colônia bacteriana foi inoculada em 3 ml de CDM isento de ferro em um tubo de cultura de vidro tratado com ácido de 25 ml e agitada da noite para o dia a 250 rpm em uma incubadora a 37° C. Um mililitro da subcultura foi então usado para inocular 500 ml de CDM em um frasco Erlenmeyer de 2500 ml no dia seguinte. As culturas foram incubadas a 37° C com agitação a 250 rpm. Culturas de CDM isentas de ferro levaram aproximadamente duas vezes mais que CDM + FeSO₄ 50 µM para atingir uma OD de 1,0 (18 h versus 36 horas). Em fase média-log (OD=0,600), alíquotas de cultura de 4x100 ml foram distribuídas em frascos Erlenmeyer de 500 ml e deixadas agitar na incubadora por 10 minutos antes da adição de soluções de ferro experimentais. A um frasco, 300 µl de lactoferrina bovina (50 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foram adicionados para uma concentração final de 150 µg/ml. A outro frasco, 50 µl de citrato férrico (100 nM) foram adicionados. O dois frascos controle restantes não receberam quaisquer suplementos. Em 5, 30, 60 e 120 minutos, 7,5 ml de cultura foram coletados e adicionados a 5 ml de solução de tiocianato de guanidina contendo β-mercaptoetanol e lauril sarcosina de sódio 0,5%. As soluções foram misturadas completamente para parar a transcrição e centrifugadas a 4.000 x g por 8 minutos a 8° C; sobrenadantes foram despejados e as células foram congeladas em 250 µl de Trizol (Invitrogen) usando um banho de etanol/gelo seco, então armazenadas a -80° C até extração de RNA.

Para extração de RNA, os péletes de célula foram descongelados em gelo e 750 µl de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram adicionados. As células foram ressuspensas através de vórtex e a pasta fluida foi transferida para um tubo de tampa de rosca de 2 ml contendo contas de sílica-zircônio de 0,1 mm, então batidas 3 x 2 minutos em um BeadBeater (Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK) com incubação em gelo entre as repetições. As pastas fluidas foram incubadas mais 20 minutos em temperatura ambiente, seguido por centrifugação para contas de pélete e componentes celulares. 400 µl de clorofórmio foram adicionados e misturados através de inversão, incubados por 10 minutos em temperatura ambiente e os tubos foram centrifugados 8 minutos a 12.000 X g a 8° C. A camada aquosa foi

removida e RNA precipitado com 400 µl de isopropanol seguido por lavagem com 1 ml de etanol 70%. Péletes de RNA transparentes foram secos ao ar rapidamente e ressuspensos em 100 µl de RNase-H₂O livre. DNA foi digerido usando kit de DNase padrão (Qiagen, Valencia CA) seguido por limpeza de acordo com as instruções do fabricante em colunas Rneasy (Qiagen).
5 Finalmente, um kit DNA-livre Turbo (Ambion, Austin, TX) foi usado para assegurar eliminação de DNA da preparação. RNA foi medido em um espectrômetro e ativado em um Agilent Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA) para verificar qualidade e quantidade antes da degeneração de cDNA para hibridização de microdisposição.
10

Análise de microdisposição foi realizada de acordo com protocolos estabelecidos. A disposição, caracterizando 3841 oligonucleotídeos de 70mer (Illumina, São Diego, CA) representando estruturas de leitura aberta (ORFs) de nove genomas de *S. aureus* sequenciados incluindo RF122 e MSA553, foi colocada em triplicata em lâminas revestidas com aminossilano Gaps II (Corning, Acton MA) usando um BioRobotics Microgrid II Array Spotter (BioRobotics, Cambridge, RU). As lâminas foram novamente hidratadas, reticuladas com UV e armazenadas sob dissecação. Imediatamente antes da hibridização, as lâminas foram incubadas por 1 hora a 42° C em tampão de pré-hibridização consistindo em 25 ml de formamida, 1,25 ml de SSC 20X, 12 ml de dH₂O, 500 µL de SDS 10% e BSA 0,5 g. As lâminas foram enxaguadas com 2 L de água MilliQ e secas através de centrifugação. Para preparar amostras, 8-10 µg de RNA bacteriano total foram incubados com 20 µg de hexâmeros aleatórios a 70° C por 10 minutos, seguido por transcrição reversa com incorporação de amino-alila usando Superscript II (Invitrogen) e dUTP acoplado à amino-alila (Sigma). cDNA rotulado foi neutralizado, purificado, seco e ressuspenso em corante fluorescente Cy3 ou Cy5 (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ); acoplamento aconteceu por 2 horas. Amostras de cDNA fluorescentemente marcadas (12 µl cada) foram lavadas usando um kit de purificação de PCR Qiagen, combinadas e adicionadas a 9,8 µl de formamida, 6,8 µl de SSX 20X, 3,4 µl de DNA de esperma de salmão (10 mg/ml, Invitrogen) e 1 µl de SDS 10%. As amostras foram
25
30

incubadas por 2 minutos a 99,9% em um ciclizador térmico e deixadas esfriar antes da aplicação à disposição. As sondas foram então aplicadas à disposição, cobertas com uma tampa de vidro e incubadas da noite para o dia em um banho de água a 42° C. As lâminas foram lavadas completamente em tampões de SCC diluídos após 12-16 horas de incubação e varridas usando um Scanner Axon 4100B e Software Axon GenePix (Axon Instruments, Union City, CA). Dados de intensidade brutos foram exportados para GeneSpring (Agilent Technologies [Silicon Genetics] Palo Alto, CA) para normalização e filtragem. Os *spots* foram globalmente normalizados, filtrados com base em valores de intensidade brutos mínimos (>1500) e as triplicatas tiveram a média tirada. Cada experimento foi realizado duas vezes e uma lâmina única foi ativada para cada um usando uma troca de corante entre os pontos de tempo compatíveis. Desta maneira, pelo menos 6 pontos de dados de troca de corante foram gerados para cada gene em cada ponto de tempo, representando pelo menos 2 réplicas biológicas. Os dados foram analisados mais através de agrupamento hierárquico (distância Euclidiana, ligação média, UPGMA) e agrupamento por *K-means* (distância medida com base em correlação não-centrada) usando EPCLUST (Jaak Vilo, EBI) e SpotFire (SpotFire, Somerville, MA). Análise de significância para Microdisposições (SAM (157)) foi usada em razões log médias-centradas usando o modelo de uma classe em todos os pontos de tempo para determinar se expressão do gene diferiu significativamente de zero. Valores delta adstringentes foram usados de maneira que a porcentagem de falsos positivos foi estimada ser zero. Um sumário de operons mostrando super- ou sub-regulagem similar através de análise SAM é mostrado na Tabela 11, apoiando a habilidade das disposições em detectar resposta biológicas.

Tabela 11. Agrupamentos operônicos com respostas transcricionais coordenadas identificados usando análise de microdisposição de expressão de gene de *S. aureus*

<u>ID do Operon</u>	<u>Função</u>	<u>Resposta</u>	<u>No. de sondas coordenadamente expressas</u>	
			<u>Genes não-regulados contíguos</u>	<u>Funcionalmente relacionados, mas não contíguos</u>
Sir	transporte de cátion	Suprarregulada em teor de ferro baixo	3	0
Fhu	transporte de cátion	Suprarregulada em teor de ferro baixo	3	1
Opp	transporte de oligopeptídeo	Suprarregulada em teor de ferro baixo	9	N/A
Mnt	transporte de cátion	Suprarregulada em teor de ferro baixo	3	1
Pfl (Formato acetiltransferase)	fermentação	Suprarregulada na presença de lactoferrina	2	4

- 5 Para clonagem padrão de proteínas, os genes apropriados foram amplificados a partir de DNA extraído de *S. aureus* (linhagem ATCC19636) através de reação em cadeia da polimerase padrão. Os iniciadores foram projetados para incorporar sítios de endonuclease de restrição *StuI* e *KpnI* e são mostrados abaixo:

- 10 Tabela 12. Iniciadores de Clonagem:

Gene (iniciador)	Sequência de Iniciador	SEQ ID NO
Pflb (5' a 3')	GCAGGCCTTTAGAAACAAATAAAAATCATG	507
Pflb (3' a 5')	TATGGTACCTTACATACTTTCATGGAATG-TACG	508

Gene (iniciador)	Sequência de Iniciador	SEQ ID NO
Opp1A (5' a 3')	GCAGGCCTAAAAAGAAAACAAGCAATTAA	509
Opp1A (3' a 5')	TATGGTACCTTATTTATACTGCATTTTCATT-GAA	510
SirA (5' a 3')	GCAGGCCTTCATCTGATAGCA AAGATA-AGG	511
SirA (3' a 5')	TATGGTACCTTATTTTGATTGTTTTTCAA-TATT	512
SYN2 (5' a 3')	GCAGGCCTAAAGAATCATCAACTAAA	513
SYN2 (3' a 5')	TATGGTACCCTTTTGTTCTTTTTTTTGA	514
FhuD (5' a 3')	GCAGGCCTACTGAAGAGAAAAGTAAATGA	515
FhuD (3' a 5')	TATGGTACCTTATTTTGCTTTTTTCTGCA-ATTTT	516
SYN1 (5' a 3')	GCAGGCCTGGTAGCGACGATA-ATGGCTCGT	517
SYN1 (3' a 5')	TATGGTACCTTATTTTCTATAAATTG-CATCTCT	518
MntC (5' a 3')	GCAGGCCTAGTGATAAGTCAAATGGCAA-ACTA	519
MntC (3' a 5')	TATGGTACCTTATTTTCATGCTTCCGTGTA-CAG	520
SstD (5' a 3')	GCAGGCCTTCAGAAACTAAAGGTTCTAAA-GAT	521
SstD (3' a 5')	TATGGTACCTTATTTTACAACCTTTTTCA-AGTT	522
FhuD2 (5' a 3')	GCAGGCCTACTAAATCTTATAAAATGGAC-GAT	523
FhuD2 (3' a 5')	TATGGTACCTTATTTTGACGCTTTAATTA-ATT	524

DNA extraído de *S. aureus* ATCC 19636 foi usado como o molde. Amplicons de DNA foram verificados através de eletroforese em gel e as faixas amplificadas de DNA foram excisadas, purificadas, digeridas e ligadas em vetor pQE30-Xa de corte, transformadas em *E. coli* XL-1 competente e avaliadas quando à resistência à ampicilina. Clones resistentes foram avaliados quanto a insertos de plasmídeo usando PCR de colônia.

Exemplo 15

Varredura de imunorreatividade de candidatos à proteína protetora

Para avaliar a reatividade de anticorpo das proteínas identificadas a partir da análise MALDI-TOF (Exemplo 13) e/ou microdisposição e análise genômica (Exemplo 14), uma varredura de duas partes foi usada para avaliar proteínas *staphylococcais* individualmente expressas. A primeira varredura rápida usou fragmentos de PCR transcricionalmente ativos para pesquisar ligação de anticorpo a quantidades pequenas de proteína candidata expressa usando um lisato de *E. coli* livre de célula. A segunda varredura usou clonagem, expressão e purificação com base em PCR padrão de proteínas em *E. coli* usando um vetor comercial (pQE30Xa, Qiagen, Valência, CA) a fim de validar candidatos positivos para a primeira varredura. A segunda varredura também gerou estoques de semente máster de células hospedeiro de *E. coli* contendo o vetor de expressão correspondendo a cada candidato à proteína imunorreativa para produção e purificação de proteína suficiente para vacinação e experimentação.

Um método de alto rendimento para geração de antígenos SIRP individuais foi usado para testar vários genes candidatos codificando proteínas *S. aureus* envolvidas em metabolismo de metal. Este método gera um amplicon de PCR transcricionalmente ativo (TAP) usando uma reação de PCR de 2 etapas com iniciadores que adicionam um rótulo His₆ promotor, terminador e C-terminal. Os amplicons transcricionalmente ativos resultantes foram usados como um molde para a produção de proteína em uma reação de transcrição/tradução *in vitro* livre de célula consistindo em lisato de célula de *E. coli*, aminoácidos e tampões. A reação de PCR de duas etapas requereu um primeiro conjunto de iniciadores específicos para o gene de interesse que também incluía uma sequência de ligante compatível com o segundo conjunto de iniciadores. Cada iniciador mostrado para a primeira etapa de PCR foi projetado para excluir sequências de sinal de processamento de membrana para prevenir integração à membrana celular e são mostrados abaixo.

Tabela 13. Iniciadores TAP:

Gene (iniciador)	Sequência de Iniciador	SEQ ID NO
Pflb (5' a 3')	AGAAGGAGATATACCATGTTAGAAACAAAT	525
Pflb (3' a 5')	TTAATGATGATGATGATGATGCATACTTT-CATG	526
Opp1A (5' a 3')	AGAAGGAGATATACCATGAGAAAACACTA	527
Opp1A (3' a 5')	TTAATGATGATGATGATGATGTTTATACTG-CAT	528
SirA (5' a 3')	ATAAGGAGATATACCATGAATAAAGTAATT	529
SirA (3' a 5')	TTAATGATGATGATGATGATGTTTT-GATTGTTT	530
SYN2 (5' a 3')	AGAAGGAGGATATACCATGAGAGGTCTAA-AACTTTT	531
SYN2 (3' a 5')	TTAATGATGATGATGATGATGATGCTTTTGTCTTTTTTTGA	532
FhuD (5' a 3')	AGAAGGAGGATATACCATGAATAGGAA-TATCGTTAAA	533
FhuD (3' a 5')	TTAATGATGATGATGATGATGATGTTTTGCTTTTTCTGCAAT	534
SYN1 (5' a 3')	AGAAGGAGGATATACCATGAAGAAATCGT-TAATTGCT	535
SYN1 (3' a 5')	TTAATGATGATGATGATGATGTTTTCTATA-AATTGCATC	536
MntC (5' a 3')	AGAAGGAGATATACCAAAAAATTAGTA	537
MntC (3' a 5')	TTAATGATGATGATGATGATGTTT-CATGCTTCC	538
SstD (5' a 3')	AGAAGGAGATATACCATGAAGAAAACAGTC	539
SstD (3' a 5')	TTAATGATGATGATGATGATGTTTTACA-ACTTT	540
FhuD2 (5' a 3')	AGAAGGAGATATACCATGAAAAAACTATTA	541
FhuD2 (3' a 5')	TTAATGATGATGATGATGATGTTTTG-CAGCTTT	542

Uma reação de PCR de 50 µl padrão foi realizada usando (1 unidade de High Fidelity Taq DNA polymerase (Invitrogen), iniciadores 0,2 µM, dNTP 2 mM (cada), Mg⁺⁺ final 2 mM e aproximadamente 5 ng de molde

de DNA de partida, tamponada para TrisSO₄ 60 mM (pH 8,9) e sulfato de amônio 18 mM). O protocolo de ciclicação de PCR incluía 1 minuto de desnaturação inicial a 94° C, seguido por 30 ciclos como segue: Desnaturar/94° C/30s; Anelar/55° C/30s; Estender/68° C, 90s. Iniciadores idênticos com uma
5 sobreposição apropriada foram utilizados para a segunda etapa da reação de PCR e foram fornecidos pelo fabricante (Genlantis). O produto de PCR de DNA resultante foi purificado para eliminar iniciador residual, sal e fragmentos de DNA e usado como um molde para uma segunda reação com um conjunto padrão de iniciadores para adicionar as sequências promotoras e
10 terminadoras usando condições similares. O molde de DNA foi então purificado e adicionado a uma mistura de reação Rapid Translation System RTS 100 livre de célula de *E. coli* (Roche) contendo 12 µl de lisato de *E. coli*, 12 µl de aminoácidos, 10 µl de mistura de reação, 1 µl de metionina adicionada, 5 µl de tampão de reconstituição e 10 µl de molde de DNA purificado da reação
15 de PCR de duas etapas. Seguindo incubação por 5 horas a 30° C, um microlitro de cada amostra de proteína (aproximadamente 0,5 µg/µl de proteína total) foi aplicado à membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) após saturação com metanol. O *blot* foi bloqueado da noite para o dia com NFD 5%/TTBS, incubado com soros de camundongo hiperimunizados aumentados, de proteína restrita em ferro (IRPE) (*Iron-restricted protein, enhanced*),
20 diluído 1:500 ou anticorpo anti-His₆ (1:500), lavado, incubado com conjugado de fosfatase alcalina (AP) (Alkaline Phosphatase) anticamundongo de cabra (1:300), lavado e desenvolvido cromogenicamente (kit de desenvolvimento de cor Bio-Rad AP) por 20 minutos. Os lisatos contendo polipeptídeos sororreativos foram identificados.
25

Os clones produzidos conforme descrito no Exemplo 14 foram cultivados para fase média-log, induzidos com IPTG 1 mM e cultivados por quatro horas. As células foram peletizadas, lavadas e lisadas em tampão de carga de SDS-PAGE fervente. Os lisatos brutos foram separados através de
30 SDS-PAGE e tingidos com Coomassie. Um segundo conjunto de proteínas separadas foi transferido para membrana PVDF e *immunoblotted* com soros de camundongo hiperimunizados com varina IRPE diluídos 1:500 em NFD

1%/TTBS. O *blot* foi lavado, incubado com anticorpo secundário anticamundongo de cabra conjugado com fosfatase alcalina (AP), lavado e desenvolvido com substrato cromogênico.

Exemplo 16

5 Preparação de composições de imunização a partir de polipeptídeos recombinantemente produzidos

A fim de isolar polipeptídeos de *S. aureus* recombinantes para formulação de uma vacina, clones de *E. coli* descritos no Exemplo 14 foram cultivados a 37° C (225 rpm) para fase média-log (OD₆₀₀=04-06) em 1L de Caldo de Soja Triptico e então induzido por 4 horas com isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo 1 mM (IPTG). As culturas foram peletizada por 10 minutos a 4° C em uma centrífuga Sorvall (400 x g) e congeladas a -80° C antes de sofrerem o procedimento de purificação. Péletes bacterianos foram então processados através de dois métodos diferentes, dependendo da solubilidade do polipeptídeo de *S. aureus* expresso em excesso.

Para polipeptídeos solúveis (por exemplo, MntC, FhuD, SYN2, SirA ou SYN1), péletes bacterianos foram ressuspensos em 25 ml de reagente BUGBUSTER (Novagen) e submetidos a 15 minutos de sonificação em gelo usando um sonificador Brandon equipado com uma micropona (ciclodútil 65%, 5 saídas). Material insolúvel foi removido por 10 minutos de centrifugação (4000 x g). O sobrenadante solúvel foi filtrado (0,2 µg) e submetido à cromatografia de afinidade com metal (Ni-NTA His-Bind, Novagen) de acordo com as instruções providas pelo fabricante.

Para polipeptídeos insolúveis (por exemplo, PfiB ou Opp1A), os péletes bacterianos foram ressuspensos em 25 ml de reagente BUGBUSTER (Novagen), postos em uma plataforma oscilante por 10 minutos e então submetida à centrifugação (15.000 x g por 12 minutos). O pélete resultante foi ressuspenso em 10 ml de BUGBUSTER mais 20 ml de BUGBUSTER diluído (1:10 em PBS) e submetido à centrifugação (5000 x g por 12 minutos). O pélete foi então ressuspenso em 20 ml de BUGBUSTER diluído e submetido a uma etapa final de centrifugação (15.000 x g por 12 minutos). O pélete final foi ressuspenso em 10 ml de Tampão A (NaH₂PO₄ 0,1M, Tris-

HCl 0,01, Ureia 8M, pH 8,0) e incubado por 10 minutos em uma plataforma oscilante em temperatura ambiente. As amostras foram então submetidas à centrifugação (12.000 x g por 20 minutos) e o sobrenadante resultante foi separado através de cromatografia por afinidade com metal (Ni-NTA His-
5 Bind, Novagen) de acordo com as instruções providas pelo fabricante, mas com as modificações que seguem. Após carregamento da coluna, 10 ml de Tampão A foram usados para equilibrar a resina. Seguindo a ligação de polipeptídeo, a coluna foi lavada com 15 ml de Tampão B (NaH₂PO₄ 0,1M, Tris-HCl 0,01, Ureia 8M, pH 6,0) e eluída usando 15 ml de Tampão C
10 (NaH₂PO₄ 0,1M, Tris-HCl 0,01, Ureia 8M, pH 4,5).

Polipeptídeos recombinantes isolados foram eluídos das colunas em um volume de 15 ml e postos em cassetes de diálise de corte de 20 kDa (Pierce) para diálise contra 2L de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Seguindo três mudanças de tampão durante 30 horas, os polipeptídeos foram removidos, filtrados (0,2 µm) e concentrados para 2-3 ml de volume usando dispositivos Centricon de corte de 20 kDa (Millipore). As concentrações dos polipeptídeos purificados foram determinadas usando o método BCA padrão (Pierce).
15

10 µg de cada polipeptídeo foram combinados e o volume ajustado para 100 µl com PBS para formar uma composição de imunização.
20

Exemplo 17

Vacinação de camundongo

Provocação IV (Estudo A)

Cinquenta camundongos BALB/C fêmeas (N=50) obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianapolis, IN) pesando 16-22 gramas foram distribuídos em 3 grupos (10-20 camundongos/grupo). Os camundongos foram alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Comida e água foram fornecidas *ad libitum* a todos os camundongos. Todas as vacinas foram formuladas com IFA 50% como um adjuvante. Os camundongos foram vacinados subcutaneamente com 0,1 ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:
25
30

Grupo 1: Placebo, vacinado com ovalbumina (70 µg/100 µl)

(Placebo, 20 camundongos).

Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (70 µg/100 µl) (Extrato de SIRP, 20 camundongos).

Grupo 3: Vacinado com polipeptídeo recombinante MntC (10 µg/100 µl) (rMntC, 10 camundongos).

Provocação IP (Estudo B)

Quarenta camundongos BALB/C fêmeas (N=40) obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) pesando 16-22 gramas foram igualmente distribuídos em 4 grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos foram alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Alimento e água foram fornecidos *ad libitum* a todos os camundongos. Todas as vacinas foram formuladas com IFA 50% como um adjuvante. Os camundongos foram vacinados subcutaneamente com 0,1 ml da composição apropriada em intervalos de 14 dias usando ou duas vacinações (Grupos 1-3) ou três vacinações (Grupo 4) como segue:

Grupo 1: Placebo, vacinado duas vezes com ovalbumina (70 µg/100 µl) (Placebo).

Grupo 2: Vacinado duas vezes com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (70 µg/100 µl) (Extrato SIRP).

Grupo 3: Vacinado duas vezes com polipeptídeos recombinante PflB, Opp1A, SirA, SYN2, FhuD, SYN1 e MntC (cada um 10 µg/100 µl, proteína total 70 µg/100 µl) (rSIRP7 (2x)).

Grupo 4: Vacinado três vezes com polipeptídeos recombinantes PflB, Opp1A, SirA, SYN2, FhuD, SYN1 e MntC (cada um 10 µg/100 µl, proteína total 70 µg/100 µl) (rSIRP7 (3x)).

Provocação IC (Estudo C)

Trinta camundongos BALB/C fêmeas (N=30) obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianapolis, IN) pesando 16-22 gramas foram igualmente distribuídos em 3 grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos foram alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Alimento e água foram fornecidos *ad libitum* a todos os camundongos. Os camundongos foram vacinados subcutaneamente

com 0,1 ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:

Grupo 1: Placebo, vacinado com ovalbumina (70 µg/100 µl) (Placebo).

5 Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (70 µg/100 µl) (Extrato de SIRP).

Grupo 3: Vacinado com polipeptídeos recombinantes PflB, Opp1A, SirA, SYN2, FhuD, SYN1 e MntC (cada um 10 µg/100 µl, proteína total 70 µg/100 µl) (rSIRP7).

10 Exemplo 18

Preparação de organismo de provocação

Provocação IV (Estudo A)

Staphylococcus aureus linhagem ATCC 25904 foi usada como um organismo de provocação. Em suma, uma alça de 1 µl de bactérias de um estoque de glicerol congelado cultivadas em TSB padrão (sem restrição de ferro) foi usada para inocular uma cultura de 20 ml de TSB e incubada a 37° C por 18 horas. 2,5 ml desta cultura foram passados para 500 ml de TSB fresco. A cultura foi incubada a 37° C por aproximadamente duas horas enquanto girando a 250 rpm até uma densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,4 (Absorbância) ser atingida (fase média-log), então as células foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos a 4° C para peletizar as bactérias. O pélete bacteriano foi lavado através de centrifugação em PBS a 4° C. O pélete final foi ressuspenso em 20 ml de PBS. A dose de provocação final foi preparada adicionando uma alíquota desta cultura bacteriana concentrada a PBS para gerar uma solução com uma OD₆₀₀ de 4,0 (A), correspondendo a aproximadamente 6,67 x 10⁸ CFU/ml. Um pouco antes da provocação, 1 ml dessas suspensões bacterianas foi serialmente diluído e plaqueado em ágar para enumerar o número de unidades de formação de colônia (CFU) por dose de camundongo.

30 Provocação IP (Estudo B)

Staphylococcus aureus linhagem ATCC 25904 foi usada como um organismo de provocação. Em suma, uma alça de 1 µl de bactérias de

um estoque de glicerol congelado cultivado em TSB padrão (sem restrição de ferro) foi usada para inocular uma cultura de 20 ml de TSB e incubada a 37° C por 18 horas. 2,5 ml desta cultura foram passados para 500 ml de TSB fresco. A cultura foi incubada a 37° C por aproximadamente duas horas enquanto girando a 250 rpm até uma densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,4 (Absorbância) ser atingida (fase média-log), então as células foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos a 4° C para peletizar as bactérias. O pélete bacteriano foi lavado através de centrifugação em PBS a 4° C. O pélete final foi ressuspense em 20 ml de PBS. A dose de provocação final foi preparada adicionando uma alíquota desta cultura bacteriana concentrada a PBS para gerar uma solução com uma OD₆₀₀ de 6,0 (A), correspondendo a aproximadamente 3,33 x 10⁹ CFU/ml. Um pouco antes da provocação, 1 ml dessas suspensões bacterianas foi serialmente diluído e plaqueado em ágar para enumerar o número de unidades de formação de colônia (CFU) por dose de camundongo.

Provocação IV (Estudo C)

Staphylococcus aureus linhagem ATCC 25904 foi usada como um organismo de provocação. Em suma, uma alça de 1 µl de bactérias de um estoque de glicerol congelado cultivadas em TSB padrão (sem restrição de ferro) foi usada para inocular uma cultura de 20 ml de TSB e incubada a 37° C por 18 horas. 2,5 ml desta cultura foram passados para 500 ml de TSB fresco. A cultura foi incubada a 37° C por aproximadamente duas horas enquanto girando a 250 rpm até uma densidade óptica (OD₆₀₀) de 0,4 (Absorbância) ser atingida (fase médio-log), então as células foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos a 4° C para peletizar as bactérias. O pélete bacteriano foi lavado através de centrifugação em PBS a 4° C. O pélete final foi ressuspense em 20 ml de PBS. A dose de provocação final foi preparada adicionando uma alíquota desta cultura bacteriana concentrada a PBS para gerar uma solução com uma OD₆₀₀ de 4,0 (A), correspondendo a aproximadamente 6,67 x 10⁸ CFU/ml. Um pouco antes da provocação, 1 ml dessas suspensões bacterianas foi serialmente diluído e plaqueado em ágar para enumerar o número de unidades de formação de colônia (CFU) por dose de

camundongo.

Exemplo 19

Provocação

Provocação IV (Estudo A)

5 Quatorze dias após a segunda vacinação, os camundongos em todos os grupos (1-3) foram intravenosamente provocados na veia lateral da cauda com 0,3 ml do organismo apropriado. Os três grupos de camundongos foram provocados identicamente com 2×10^8 CFU de *S. aureus* linhagem ATCC 25904 por camundongo. A mortalidade foi registrada diariamente por 10 dias após provocação.

10 Quando comparando os camundongos provocados com o isolato ATCC 25904, 80% dos camundongos do Grupo 1 vacinados com placebo morreram dentro de 10 dias de provocação (Tabela 14). Isto demonstrou que a linhagem ATCC 25904 causou uma taxa alta de mortalidade em camundongos no nível de dose administrado. Em contraste com os camundongos no Grupo 1, apenas 25% dos camundongos no Grupo 2 (vacinados com proteínas extraídas da linhagem ATCC 25904 seguindo crescimento em condições isentas de ferro, Extrato de SIRP) morreram dentro de 10 dias pós-provocação. Esses resultados ilustraram que os camundongos provocados com a linhagem ATCC 25904 foram significativamente protegidos pela vacinação com a composição de proteína derivada de ATCC 25904 isenta de ferro ($p=0,0006$, teste log-rank para mortalidade). Ainda, apenas 50% dos camundongos no Grupo 3 (vacinados com polipeptídeos MntC recombinantes, rMntC) morreram dentro de 10 dias pós-provocação, indicando que proteínas recombinantes ofereceram proteção contra provocação com a linhagem ATCC 25904 ($p=0,100$, teste log-rank para mortalidade).

Provocação IP (Estudo B)

30 Quatorze dias após a segunda vacinação, os camundongos em todos os grupos (1-4) foram intravenosamente provocados com 0,5 ml do organismo apropriado. Os três grupos de camundongos foram provocados identicamente com 1×10^9 CFU de *S. aureus* linhagem ATCC 25904 por camundongo. A mortalidade foi registrada diariamente por 10 dias após pro-

vocação.

Quando comparando os camundongos provocados com o isolato ATCC 25904, 60% dos camundongos do Grupo 1 vacinados com placebo morreram dentro de 10 dias de provocação (Tabela 14). Isto demonstrou que a linhagem ATCC 25904 causou uma taxa moderada de mortalidade em camundongos no nível de dose administrado. Em contraste com os camundongos no Grupo 1, apenas 30% dos camundongos no Grupo 2 (vacinados com proteínas extraídas da linhagem ATCC 25904 seguindo crescimento em condições isentas de ferro, Extrato de SIRP) morreram dentro de 10 dias pós-provocação. Esses resultados ilustraram que os camundongos vacinados com a composição de proteína derivada de ATCC 25904 isenta de ferro morreram na metade da taxa de camundongos vacinados com placebo quando provocados com a linhagem ATCC 25904 ($p=0,143$, teste log-rank para mortalidade). Camundongos vacinados com a combinação de sete proteínas recombinantes mostraram um nível maior de proteção com relação a placebo. Apenas 20% dos camundongos no Grupo 3 (vacinados 2x com polipeptídeos recombinantes, rSIRP7 2x) morreram dentro de 10 dias de provocação e apenas 10% dos camundongos no Grupo 4 (vacinados 3x com polipeptídeos recombinantes, rsIRP7 3x) morreram dentro de 10 dias de provocação, indicando que três vacinações com proteínas recombinantes ofereceram proteção significativa contra provocação com linhagem ATCC 25904 ($p=0,040$, teste log-rank para mortalidade).

Provocação IV (Estudo C)

Quatorze dias após a segunda vacinação, os camundongos em todos os grupos (1-3) foram intravenosamente provocados na veia lateral da cauda com 0,3 ml do organismo apropriado. Os três grupos de camundongo foram provocados identicamente com 2×10^8 CFU de *S. aureus* linhagem ATCC 25904. A mortalidade foi registrada diariamente por 10 dias após provocação.

Quando comparando os camundongos provocados com o isolato de ATCC 25904, 90% dos camundongos do Grupo 1 vacinados com placebo morreram dentro de 10 dias de provocação (Tabela 14). Isto demonstrou que

a linhagem ATCC 25904 causou uma taxa alta de mortalidade em camundongos no nível de dose administrado. Em contraste com os camundongos no Grupo 1, apenas 40% dos camundongos no Grupo 2 (vacinação com proteínas extraídas da linhagem ATCC 25904 seguindo crescimento em condições isentas de ferro, Extrato de SIRP) morreram dentro de 10 dias pós-provocação. Esses resultados ilustraram que os camundongos provocados com a linhagem ATCC 25904 foram significativamente protegidos pela vacinação com a composição de proteína derivada de ATCC 25904 isenta de ferro ($p=0,0164$, teste log-rank para mortalidade). Ainda, apenas 40% dos camundongos no Grupo 3 (vacinação com polipeptídeos recombinantes, rSIRP7) morreram dentro de 10 dias pós-provocação, indicando que proteínas recombinantes ofereceram proteção significativa contra provocação com a linhagem ATCC 25904 ($p=0,0255$, teste log-rank para mortalidade).

Os resultados são mostrados na Tabela 14 e na Figura 161.

15 Tabela 14. Mortalidade de Camundongos Vacinados e Não-vacinados Seguindo Provocação com isolato ATCC 25904 de *Staphylococcus aureus*

Grupos	No. de camundongos	No. de mortos	Mortalidade percentual (%)
Provocação IV (Estudo A)			
Grupo 1 (Placebo)	20	16/20	80
Grupo 2 (Extrato de SIRP)	10	5/20	25
Grupo 3 (rMntC)	10	5/10	50
Provocação IP (Estudo B)			
Grupo 1 (Placebo)	10	6/10	60
Grupo 2 (Extrato de SIRP)	10	3/10	30
Grupo 3 (rSIRP (2x))	10	2/10	20
Grupo 4 (rSIRP (3x))	10	1/10	10
Provocação IV (Estudo C)			
Grupo 1 (Placebo)	10	9/10	90
Grupo 2 (Extrato de SIRP)	10	4/10	40
Grupo 3 (rMntC)	10	4/10	40

Exemplo 20

Imunização passiva usando polipeptídeos recombinantemente preparados

Uma composição de anticorpo policlonal é preparada conforme

descrito no Exemplo 8, exceto que os camundongos são vacinados com uma composição de polipeptídeos recombinante preparada conforme descrito no Exemplo 16.

5 A composição de anticorpo resultante é usada para imunizar passivamente camundongos conforme descrito no Exemplo 9. Os camundongos imunizados são provocados conforme descrito no Exemplo 9.

Os camundongos imunizados vão mostrar mortalidade menor comparado com camundongos não-vacinados e vacinados com placebo.

Exemplo 21

10 Fermentação e isolamento em grande escala de polipeptídeos recombinantemente produzidos

Um estoque de semente máster da *E. coli* recombinante do Exemplo 14 pode ser preparado através de cultivo do organismo em 2000 ml de meio RM estéril (20 casaminoácidos, 60 g de Na₂HPO₄, 30 g de KH₂PO₄, 15 5 g de NaCl, 10 g de NH₄Cl por litro e 100 ug/ml de ampicilina) por 8 horas a 37° C. As bactérias podem ser coletadas através de centrifugação a 10.000 x g por 30 minutos. A cultura pode ser lavada duas vezes através de centrifugação (10.000 x g) e o pélete bacteriano final ressuspensão em 500 ml meio RM estéril contendo glicerol estéril 20%. Um mililitro da cultura será transfe- 20 rido para um criofrasco de 2 ml e armazenado a -85° C.

Um criofrasco (1 ml) do estoque de semente máster recombinante pode ser usado para inocular um frasco de cultura de 100 ml contendo o meio descrito acima, com a exceção de ter 2 g de casamino ácidos e glicose 0,5% ("meio RM modificado"). A cultura pode ser incubada a 37° C por sete 25 horas, momento quando ela pode ser inoculada em 2 litros de meio RM modificado e deixada crescer por mais quatro horas a 37° C. Esta cultura pode ser usada para inocular um fermentador de bancada BIOFLOW 4 New Brunswick de 30 litros carregado com 20 litros de meio RM modificado exceto pelo fato que a concentração de casaminoácidos será de 20 g/litro ("meio 30 RM de fermentação"). O pH do meio de fermentação pode ser mantido entre 6,9 e 7,2 através de titulação automática com NaOH 30% e HCl 10%. A cultura de fermentação pode ser agitada a 350 rev/min e a cultura pode ser ae-

rada com 11 litros/minuto a 37° C. Espumação pode ser controlada automaticamente através da adição de desespumante de silicone 0,4% (Antiespumante-B, J.T. Baker, NJ). A cultura pode ser deixada crescer continuamente nessas condições por quatro horas ($OD_{600}=4,0-6,0$), momento quando a cultura pode ser bombeada em um fermentador de 150 litros (W.B. Moore, Easton, PN), carregada com 10 litros de meio RM de fermentação e desespumante 0,2%. Os parâmetros da fermentação podem ser como segue: 650 rpm, DO 60%, ar 50 slpm, pressão contrária 68,94 Kpa (10 psi), 37° C, e pH mantido a 7,2 com NaOH. Após atingir crescimento de fase exponencial final (aproximadamente seis horas, $OD_{600}=15,0$), proteínas recombinantes podem ser induzidas através da adição de 150 ug/ml de IPTG. A fermentação pode ser deixada crescer por mais três horas, ponto onde a fermentação pode ser terminada diminuindo a temperatura do fermentador para 18° C (OD_{600} 20-25 em uma diluição 1:100).

Após fermentação, os polipeptídeos recombinantemente produzidos podem ser coletados através de meios convencionais. As células são rompidas (por exemplo, através de homogeneização para liberar os polipeptídeos recombinantemente produzidos, alguns dos quais são solúveis e alguns dos quais são insolúveis).

Polipeptídeos solúveis podem ser concentrados através de filtração de fluxo tangencial, solubilizados em detergente e coletados através de cromatografia por afinidade com metal. Os polipeptídeos solúveis coletados podem ser isolados conforme descrito para o isolamento de polipeptídeos solúveis no Exemplo 16.

Proteínas insolúveis podem ser coletadas através de centrifugação de alta velocidade. O pélete de polipeptídeos insolúveis pode ser coletado e então isolado conforme descrito para o isolamento de polipeptídeos insolúveis no Exemplo 16.

Exemplo 22

30 Vacinação de camundongo

Polipeptídeos SirA, SYN2, FhuD e MntC recombinantemente produzidos são preparados e isolados conforme descrito no Exemplo 16.

Trinta camundongos BALB/C fêmeas (N=30) obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) pesando 16-22 gramas são igualmente distribuídos em três grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos são alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Comida e água são fornecidas *ad libitum* a todos os camundongos. Os camundongos são vacinados subcutaneamente com 0,1 ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:

Grupo 1: Placebo, vacinado com ovalbumina (40 µg/100 µl)

Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (70 µg/100 µl)

Grupo 3: Vacinado com polipeptídeos recombinantes SirA, SYN2, FhuD e MntC (cada um 10 µg/100 µl, proteína total 40 µg/100 µl).

Os camundongos são provocados conforme descrito no Exemplo 19. Os camundongos no Grupo 3 vão exibir mortalidade reduzida comparado com camundongos no Grupo 1.

Exemplo 23

Vacinação de camundongo

Polipeptídeo PflB recombinantemente produzido é preparado e isolado conforme descrito no Exemplo 16.

Trinta camundongos BALB/C fêmeas (N=30) obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) pesando 16-22 gramas são igualmente distribuídos em três grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos são alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Comida e água são fornecidas *ad libitum* a todos os camundongos. Os camundongos são vacinados subcutaneamente com 0,1ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:

Grupo 1: Placebo, vacinado com ovalbumina (10 µg/100 µl)

Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (10 µg/100 µl)

Grupo 3: Vacinado com polipeptídeos recombinantes PflB (cada um 10 µg/100 µl).

Os camundongos são provocados conforme descrito no Exem-

plo 19. Os camundongos no Grupo 3 vão exibir mortalidade reduzida comparado com camundongos no Grupo 1.

Exemplo 24

Vacinação de camundongo

5 Polipeptídeo Opp1A recombinantemente produzido é preparado e isolado conforme descrito no Exemplo 16.

Trinta camundongos BALB/C fêmeas (N=30) obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) pesando 16-22 gramas são igualmente distribuídos em três grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos são alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Comida e água são fornecidas ad libitum a todos os camundongos. Os camundongos são vacinados subcutaneamente com 0,1ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:

Grupo 1: Placebo, vacinado com ovalbumina (10 µg/100 µl)

15 Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (10 µg/100 µl)

Grupo 3: Vacinado com polipeptídeos recombinantes Opp1A (cada um 10 µg/100 µl).

20 Os camundongos são provocados conforme descrito no Exemplo 19. Os camundongos no Grupo 3 vão exibir mortalidade reduzida comparado com camundongos no Grupo 1.

Exemplo 25

Vacinação de camundongo

25 Polipeptídeo SirA recombinantemente produzido é preparado e isolado conforme descrito no Exemplo 16.

Trinta camundongos BALB/C fêmeas (N=30) obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) pesando 16-22 gramas são igualmente distribuídos em três grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos são alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Comida e água são fornecidas ad libitum a todos os camundongos. Os camundongos são vacinados subcutaneamente com 0,1ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:

Grupo 1: Placebo, vacinado com ovalbumina (10 µg/100 µl)

Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (10 µg/100 µl)

5 Grupo 3: Vacinado com polipeptídeos recombinantes SirA (cada um 10 µg/100 µl).

Os camundongos são provocados conforme descrito no Exemplo 19. Os camundongos no Grupo 3 vão exibir mortalidade reduzida comparado com camundongos no Grupo 1.

Exemplo 26

10 Vacinação de camundongo

Polipeptídeo SYN2 recombinantemente produzido é preparado e isolado conforme descrito no Exemplo 16.

Trinta camundongos BALB/C fêmeas (N=30) obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) pesando 16-22 gramas são igualmente distribuídos em três grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos são alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Comida e água são fornecidas ad libitum a todos os camundongos. Os camundongos são vacinados subcutaneamente com 0,1ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:

20 Grupo 1: Placebo, vacinado com ovalbumina (10 µg/100 µl)

Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (10 µg/100 µl)

Grupo 3: Vacinado com polipeptídeos recombinantes SYN2 (cada um 10 µg/100 µl).

25 Os camundongos são provocados conforme descrito no Exemplo 19. Os camundongos no Grupo 3 vão exibir mortalidade reduzida comparado com camundongos no Grupo 1.

Exemplo 27

Vacinação de camundongo

30 Polipeptídeo FhuD recombinantemente produzido é preparado e isolado conforme descrito no Exemplo 16.

Trinta camundongos BALB/C fêmeas (N=30) obtidos do Harlan

Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) pesando 16-22 gramas são igualmente distribuídos em três grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos são alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Comida e água são fornecidas ad libitum a todos os camundongos. Os camundongos são vacinados subcutaneamente com 0,1ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:

Grupo 1: Placebo, vacinado com ovalbumina (10 µg/100 µl)

Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (10 µg/100 µl)

Grupo 3: Vacinado com polipeptídeos recombinantes FhuD (cada um 10 µg/100 µl).

Os camundongos são provocados conforme descrito no Exemplo 19. Os camundongos no Grupo 3 vão exibir mortalidade reduzida comparado com camundongos no Grupo 1.

15 Exemplo 28

Vacinação de camundongo

Polipeptídeo SYN1 recombinantemente produzido é preparado e isolado conforme descrito no Exemplo 16.

Trinta camundongos BALB/C fêmeas (N=30) obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) pesando 16-22 gramas são igualmente distribuídos em três grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos são alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Comida e água são fornecidas ad libitum a todos os camundongos. Os camundongos são vacinados subcutaneamente com 0,1ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:

Grupo 1: Placebo, vacinado com ovalbumina (10 µg/100 µl)

Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (10 µg/100 µl)

Grupo 3: Vacinado com polipeptídeos recombinantes SYN1 (cada um 10 µg/100 µl).

Os camundongos são provocados conforme descrito no Exemplo 19. Os camundongos no Grupo 3 vão exibir mortalidade reduzida compa-

rado com camundongos no Grupo 1.

Exemplo 29

Vacinação de camundongo

5 Polipeptídeo MntC recombinantemente produzido é preparado e isolado conforme descrito no Exemplo 16.

Trinta camundongos BALB/C fêmeas (N=30) obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) pesando 16-22 gramas são igualmente distribuídos em três grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos são alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Comida e água são fornecidas ad libitum a todos os camundongos. Os camundongos são vacinados subcutaneamente com 0,1ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:

Grupo 1: Placebo, vacinado com ovalbumina (10 µg/100 µl)

15 Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (10 µg/100 µl)

Grupo 3: Vacinado com polipeptídeos recombinantes MntC (cada um 10 µg/100 µl).

Os camundongos são provocados conforme descrito no Exemplo 19. Os camundongos no Grupo 3 vão exibir mortalidade reduzida comparado com camundongos no Grupo 1.

Exemplo 30

Vacinação de camundongo

Polipeptídeo SstD recombinantemente produzido é preparado e isolado conforme descrito no Exemplo 16.

25 Trinta camundongos BALB/C fêmeas (N=30) obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) pesando 16-22 gramas são igualmente distribuídos em três grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos são alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Comida e água são fornecidas ad libitum a todos os camundongos. Os camundongos são vacinados subcutaneamente com 0,1ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:

Grupo 1: Placebo, vacinado com ovalbumina (10 µg/100 µl)

Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (10 µg/100 µl)

Grupo 3: Vacinado com polipeptídeos recombinantes SstD (cada um 10 µg/100 µl).

5 Os camundongos são provocados conforme descrito no Exemplo 19. Os camundongos no Grupo 3 vão exibir mortalidade reduzida comparado com camundongos no Grupo 1.

Exemplo 31

Vacinação de camundongo

10 Polipeptídeo FhuD2 recombinantemente produzido é preparado e isolado conforme descrito no Exemplo 16.

Trinta camundongos BALB/C fêmeas (N=30) obtidos do Harlan Breeding Laboratories (Indianápolis, IN) pesando 16-22 gramas são igualmente distribuídos em três grupos (10 camundongos/grupo). Os camundongos são alojados em gaiolas de camundongo de policarbonato (N=5 camundongos por gaiola). Comida e água são fornecidas ad libitum a todos os camundongos. Os camundongos são vacinados subcutaneamente com 0,1ml da composição apropriada duas vezes em intervalos de 14 dias como segue:

Grupo 1: Placebo, vacinado com ovalbumina (10 µg/100 µl)

20 Grupo 2: Vacinado com proteínas ATCC 25904 expressas sob restrição de ferro (10 µg/100 µl)

Grupo 3: Vacinado com polipeptídeos recombinantes FhuD2 (cada um 10 µg/100 µl).

25 Os camundongos são provocados conforme descrito no Exemplo 19. Os camundongos no Grupo 3 vão exibir mortalidade reduzida comparado com camundongos no Grupo 1.

Exemplo 32

Polipeptídeos recombinantes são especificamente ligados por soros gerados por infecção por *S. aureus*

30 *S. aureus* foram preparadas como organismos de provocação conforme descrito no Exemplo 4 e usadas para provocar camundongos conforme descrito no Exemplo 5 ou 19. Soros foram obtidos de camundongos

ou antes da provocação ou de camundongos que tinham recebido vacina de placebo que tinham sido provocados com *S. aureus* Newman e se recuperaram (convalescentes). Sangue foi coletado de camundongos provocados e não-provocados e soros foram obtidos através de centrifugação. Os soros foram usados para avaliar a reatividade dos polipeptídeos recombinantemente produzidos individuais usando um método de *immunoblot* descrito no Exemplo 15.

Soros coletados de camundongos antes da provocação não reagiram com qualquer um dos polipeptídeos recombinantes.

Anticorpo nos soros produzidos como um resultado de provocação com *S. aureus* reagiram com os polipeptídeos recombinantemente produzidos conforme mostrado na Figura 202. Anticorpo criado contra polipeptídeos expressos durante infecção por *S. aureus* reconhece variantes recombinantemente produzidas dos polipeptídeos. Desta maneira, polipeptídeos recombinantes são substitutos imunológicos para – por exemplo, fragmentos imunológicos de – polipeptídeos imunológicos expressos pela *S. aureus* de provocação.

Exemplo 33

Anticorpo contra polipeptídeos recombinantemente produzidos e polipeptídeos de membrana regulados por ferro extraídos diretamente de reação cruzada de células de *S. aureus*

Polipeptídeos regulados por ferro recombinantes são expressos e purificados conforme descrito no Exemplo 16. Polipeptídeos de membrana regulados por ferro são extraídos diretamente de células de *S. aureus* cultivadas em condições com baixo teor de ferro conforme descrito no Exemplo 1. Os polipeptídeos recombinantes são formulados em uma vacina conforme descrito no Exemplo 16 e usados para vacinar camundongos conforme descrito no Exemplo 17. Os polipeptídeos extraídos com *S. aureus* são formulados em vacinas conforme descrito no Exemplo 2 e usados para vacinar camundongos conforme descrito no Exemplo 3. Para as vacinas de polipeptídeo recombinante, um polipeptídeo recombinante único será formulado na vacina. Antissoros de camundongos vacinados são coletados e usados para

immunoblots conforme descrito no Exemplo 15.

Os antissoros de animais vacinados com polipeptídeos regulados por ferro recombinantemente produzidos são usados ainda para avaliar a reatividade com polipeptídeos regulados por ferro extraídos seguindo a
5 separação dos polipeptídeos regulados por ferro extraídos através de SDS-PAGE. Antissoros de animais vacinados com polipeptídeos recombinantes vão se ligar a polipeptídeos extraídos separados por SDS-PAGE apropriados onde epítomos de anticorpo são conservados entre os polipeptídeos extraídos e os polipeptídeos recombinantemente produzidos.

10 Os antissoros de animais vacinados com polipeptídeos regulados por ferro extraídos são usados ainda para avaliar a reatividade com polipeptídeos regulados por ferro recombinantemente produzidos individuais seguindo a separação dos polipeptídeos recombinantemente regulados através de SDS-PAGE. Antissoros de animais vacinados com polipeptídeos extraídos se ligarão a polipeptídeos recombinantes separados por SDS-PAGE
15 onde epítomos de anticorpo são conservados entre os polipeptídeos recombinantemente produzidos e os polipeptídeos extraídos.

Exemplo 34

Análise *Western blot* de proteínas de *S. aureus* recombinantes

20 Proteínas de *S. aureus* recombinantes foram preparadas conforme descrito no Exemplo 16, então submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio 10% e transferidas para membranas de nitrocelulose (BioRad, Hercules, CA) para análise *Western blot*. *Blots* individuais foram reagidos com soro de doadores humanos saudáveis
25 (nenhuma infecção por *Staphylococcus* relatada) ou convalescentes (*S. aureus* Resistente à Meticilina).

Como um controle para identificar cada proteína marcada com Histidina recombinante, cada *blot* foi co-incubado com anticorpos anti-Histidina (Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA e QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) para identificar as proteínas recombinantes usando
30 análise de duas cores. Todos os antissoros primários foram usados em uma diluição 1:1000 e incubados por 1 hora em um oscilador. Seguindo várias

lavagens com TBS+Tween 0,05% para remover anticorpo não-ligado, as membranas foram subseqüentemente incubadas com um anticorpo secundário humano conjugado a corante 800CW (Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA), anticorpo secundário de camundongo conjugado a corante 680 (Li-cor Bioscience, Lincoln, NE) ou um anticorpo secundário de coelho conjugado a corante 800CW (Li-Co Bioscience) na diluição recomendada pelo fabricante, por 1 hora, no escuro. As membranas foram lavadas mais três a cinco vezes adicionais com Tween 0,005% TBS com a última lavagem em TBS apenas. Sinais fluorescentes (680 e 800) foram detectados usando o Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences). Os resultados são mostrados na Figura 203 (saudáveis) e Figura 204 (convalescentes).

Exemplo 35

Expressão na superfície de *S. aureus* DU5875 de polipeptídeos regulados por metal

S. aureus linhagem DU5875 (cap-, spa-) foi cultivada em condições com ferro (TSB + cloreto férrico 0,3 mM) ou sem ferro (TSB + dipiridila 1 mM) para uma OD₆₀₀ de aproximadamente 0,6.

Nos painéis A-C da Figura 205, *S. aureus* linhagem DU5875 foi cultivada em condições sem ferro para uma OD₆₀₀ de aproximadamente 0,75 e congelada. As bactérias foram descongeladas, lavadas em PBS e ressuspensas em PBS + IgG de Porco 1% + BSA 1% como uma etapa de bloqueio. Antissoro de camundongo criado contra FhuD, Opp1A ou PflB foi usado em uma diluição de 1:100 para tingir aproximadamente 2x10⁶ bactérias. Soro de camundongo pré-ímune foi usado como um controle negativo. As bactérias foram então lavadas em tampão de bloqueio e incubadas com um anticorpo secundário anticamundongo de cabra conjugado AF633 e analisadas em um citômetro de fluxo. As bactérias incubadas com soro de camundongo pré-ímune, a 1:100, foram usadas como um controle negativo.

No painel D da Figura 205, *S. aureus* linhagem DU5875 foi cultivada em condições com ferro para uma OD₆₀₀ de aproximadamente 2,0 e congelada. As bactérias foram descongeladas, lavadas em PBS e ressus-

5 pensas em PBS+ IgG de Porco 0,2% + BSA 0,1% como uma etapa de bloqueio. Antissoro de camundongo criado contra rSIRP7 foi usado em uma diluição de 1:50 para tingir aproximadamente 5×10^7 bactérias, com soro de camundongo pré-imune usado como um controle negativo. As bactérias foram então lavadas em tampão de bloqueio e incubadas com um anticorpo secundário anticamundongo de cabra AF633-conjugado e analisadas em um citômetro de fluxo.

Os resultados deste ensaio indicam que os anticorpos de murino criados contra as proteínas SIRP se ligam a células de *S. aureus*. As células cultivadas sob condições sem ferro se ligam a mais anticorpo do que células cultivadas sob condições com ferro, provendo evidência adicional que FhuD, Opp1A e PflB são expressas em níveis mais altos sob condições de baixo teor de ferro e são antígenos que podem induzir atividade imunológica contra *Staphylococcus spp.* O aumento em intensidade de fluorescência média (MFI) (*Median Fluorescence Intensity*) demonstra o aumento relativo em fluorescência quando anticorpos anti-SIRP se ligam a células de *S. aureus* comparado com a MFI de soro de camundongo pré-imune, os resultados são mostrados na Figura 205.

Exemplo 36

20 Um ensaio Luminex foi usado para avaliar expressão de citocina por esplenócitos de camundongos imunizados com a combinação (rSIRP7) de componentes SIRP recombinantes PflB (SEQ ID NO:353), Opp1A (SEQ ID NO:364), SirA (SEQ ID NO:375), SYN2 (SEQ ID NO:386), FhuD (SEQ ID NO:397), SYN1 (SEQ ID NO:408 e MntC (SEQ ID NO:419) ou placebo, então reestimulados com Extrato de SIRP (SIRPE) ou rSIRP7. Várias citocinas foram suprar-reguladas quando da reestímulação e os perfis de citocina induzida por reestímulação de SIRPE e rSIRP7 foram similares. O perfil de citocina geral em resposta à reestímulação de rSIRP7 ou SIRPE lembrou aquele esperado de uma resposta imune tipo Th1/Th17 e demonstra que
25
30 vacinação com os componentes SIRP recombinantes induz uma resposta imune celular que pode ser medida com base em expressão de citocina.

Métodos. Os camundongos foram vacinados duas vezes, 14 di-

as de intervalo, com 70 µl de proteína total (OVA, Extrato de SIRP ou rSIRP7) formulada com IFA 50%. Células T CD4⁺ purificadas de suspensões de esplenócitos por seleção negativa usando um kit de isolamento de célula T CD4⁺ e colunas LD (Miltenyi Biotec, Inc., Auburn, CA). Em suma, anticorpos biotinizados foram usados para marcar todas as células exceto células T CD4⁺, e então contas magnéticas conjugadas com estreptavidina usadas para remover essas células da mistura com uma coluna magnética, deixando células T CD4⁺ altamente purificadas.

As células T CD4⁺ resultantes foram verificadas ser mais de 95% puras com base em expressão de CD3 e CD4. Esplenócitos puros foram tratados com Mitomicina C para gerar células apresentando antígeno mitoticamente inativas. 4 x 10⁵ APC adicionadas a 5 x 10⁵ células T CD4⁺ mais antígeno de estimulação, seguido por 42 horas de incubação. Os sobrenadantes foram analisados através de Luminex usando os parâmetros de ensaio padrão. Os resultados são mostrados na Figura 206.

Exemplo 37

Extratos de *S. aureus* de várias linhagens (Newman, Reynolds) foram preparados usando o método descrito no Exemplo 1. Células de *S. aureus* foram cultivadas ou em meio restrito em ferro contendo 1000 µM de 2,2-dipiridila (Sigma-Aldrich St. Louis, MO) ou meios com ferro contendo 300 µM de FeCl₃ (Sigma-Aldrich St. Louis, MO).

As proteínas dentro dos extratos de membrana de *S. aureus* de culturas com ferro e sem ferro foram identificadas e quantificadas usando espectrometrias de massa ITRAQ e LCQ. Marcação modificada com amina de extratos de membrana de linhagem Newman de *Staphylococcus aureus* deficiente em ferro e com ferro foi realizada com reagentes ITRAQ-8plex (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) usando 40,0 µg de extrato de membrana (reagentes 113 versus 115) de acordo com o protocolo 8Plex do fabricante. Cromatografia de troca de cátion foi aplicada usando uma coluna MCX (Waters Corp., Milford, MA) e os peptídeos separados usando um sistema ULTIMATE 3000 NANO LC (Dionex Corp. Bannockburn, IL) acoplado a modo ESI usando um espectrômetro de massa QSTAR XL (Applied Biosys-

temss, Inc, Foster City, CA).

A razão de polipeptídeos regulados por metal produzidos por células cultivadas em meios restritos em ferro comparado com meios com ferro foi medida. A razão é uma medida relativa de expressão de proteína e não provê dados indicando uma quantidade absoluta de proteína presente no extrato. Os resultados são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15

Proteína	Identificada em extrato	Aumento em vezes em teor de ferro baixo
MntC	Sim	22
SYN1	Sim	Não-determinado
FhuD	Não	Não-determinado
SYN2	Sim	23
SirA	Sim	36
Opp1A	Sim	Não-determinado
PfIB	Sim	Não-determinado
FhuD2	Sim	6
SstD	Sim	14

Exemplo 38

Um ensaio de queima oxidativa pode ser usado para medir a produção de espécies oxigênio-reativas por neutrófilos, uma indicação de uma resposta inflamatória. Para obter neutrófilos a partir de sangue fresco, as células vermelhas de sangue humano fresco são lisadas através da adição de tampão de lise (NH₄Cl 150 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA dissódico 1 mM, pH 7,4) em uma diluição 1:10, incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas por 10 minutos a 430 x g. O sobrenadante é removido através de inversão do tubo e os péletes são lavados duas vezes com PBS, então ressuspensos em 5 ml de RPMI-Hepes FCS 5% + Glutamina (RPMI completo) e enumerados usando um MULTISIZER (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) após uma diluição 1/500 de suspensão celular em ISOTON (20 µl de células em 10 ml de ISOTON, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA).

Para a preparação de bactérias, *S. aureus* linhagem Lowenstein

é semeada em meio TSB e cultivada por 20 horas a 37° C em 50 ml de meio. A partir desta cultura, 5 ml são peletizado por 10 minutos a 4000 rpm a 4° C. O pélete é então lavado com 50 ml de PBS e novamente peletizado através de centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm a 4° C. A etapa de lavagem é repetida e o pélete de bactéria é ressuspensão em 5 ml de PBS. As bactérias são ajustadas para uma densidade teórica de 1.10^9 CFU/ml e as diluições celulares são plaqueadas em ágar e incubadas para enumeração exata no dia seguinte.

Para descomplementar os soros, todos os soros são incubados por 30 minutos a 56° C. Misturas de soros e células são realizadas em placas DW estéreis de polipropileno em um volume final de 500 µl por cavidade. Em cada cavidade, os reagentes que seguem são adicionados (conforme mostrado na Tabela 16) na ordem: meio de cultura (RPMI-Hepes, glutamina, FCS 5%), bactérias vivas na concentração apropriada, os soros na diluição apropriada, o complemento, hPMNs na concentração apropriada e, finalmente, a molécula DHR (Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA) como o marcador da queima oxidativa. As placas são incubadas por 25 minutos a 37° C com agitação. A reação é parada através da incubação das placas por cinco minutos em gelo.

20 Tabela 16

Reagente	Identificação	Conc. De trabalho	Vol./ cavidade	Concentração final (em 500 µl)
Bactérias vivas	TSB, 20h, 37°C 10^9 CFU/ml	$1.25.10^8$ CFU/ml	200 µl	5.10^7 CFU/ml
Leucócitos de sangue integral	De 2 doadores diferentes após a lise de célula sanguínea	$2.5.10^6$ cells/ml	100 µl	$0,5.10^6$ cells/ml
DHR	Life Technologies, Inc. No. Cat. D632 (10 mg/ml)	100 µg/ml	50 µl	10 µg/ml
Complemento de coelho bebê	Produzido em casa	1/10	50 µl	1/100 (1%)

Reagente	Identificação	Conc. De trabalho	Vol./ cavidade	Concentração final (em 500 µl)
Soros	Soro de camundongo imunizado com adjuvante sozinho	1/10	50µl	1/100
	Controle célula anti-integral	1/100	50µl	1/1000
	Proteína Anti-S. aureus	1/10 and 1/100	50µl	1/100 e 1/1000

Para análise citométrica de fluxo, as PMNs humanas são primeiro identificadas de acordo com seu tamanho e granularidade e então verificadas através de expressão de superfície de marcadores específicos (CD35, CD16, GR1, etc), então marcador de queima oxidativa. Os dados são fornecidos em termos de porcentagem de hPMNs ativadas capazes de induzir queima oxidativa em comparação com o grupo controle negativo (Didier, 2003; Ploppa, 2008).

Exemplo 39

Ensaio Opsonofagocítico

Um ensaio opsonofagocítico (OPA) foi desenvolvido para estimular a atividade fagocítica funcional de soro para *Staphylococcus aureus* através da medição da atividade opsonica dependente de complemento do soro. O OPA é sumarizado na Tabela 17. Duas linhagens de *S. aureus* são usadas neste ensaio. A linhagem DU5875, que não produz cápsula ou proteína A, é usada para controlar melhor o ensaio. A linhagem LST4 Lowenstein, que expressa cápsula e proteína A, é usada como uma linhagem do tipo selvagem no ensaio. O número de bactérias usadas no ensaio é dependente da fonte das células sanguíneas brancas efetoras e varia em concentração de a partir de 1×10^5 cfu/ml a 5×10^7 cfu/ml. Células sanguíneas brancas de voluntários saudáveis humanos ou de uma linhagem de célula de leucemia promielocítica humana, HL60, são usadas como células efetoras fagocíticas. Como a Tabela 17 indica, o número de células efetoras usadas no ensaio é dependente da fonte das células. Soro de coelho bebê é usado como

uma fonte de complemento e é diluído de 1% a 10% dependendo do lote de soro a fim de maximizar a atividade de complemento funcional do soro de coelho enquanto minimizando a toxidez. Soros sofrendo teste quanto à atividade opsônica, pré- ou pós-imunização, são descomplementados a 56° C por 30 minutos e são testados no ensaio em uma diluição de 1:20 a 1:2.000.000. Fagocitose é determinada através de contagens viáveis (cfu) de *S. aureus*. Soro de teste que demonstra uma perda significativa de cfu em combinação com complemento ativo quando comparado com soro pré-imune é considerado opsônico. Os dados de ensaio são analisados através do Teste t de Student usando distribuição de uma variável com variância desigual. (Kim 2010; Stranger-Jones 2006; Dryla 2005).

Tabela 17

Reagente	Concentração final
Bactérias vivas	aprox. 1×10^5 cfu/ml quando usando células efetoras HL-60 aprox. 5×10^7 cfu/ml quando usando WBCs humanas saudáveis
Células efetoras	Linhagem de célula humana HL-60 quimicamente induzida para diferenciar com N,N-dimetilformamida diluída para 10^6 /ml ou células sanguíneas brancas humanas de voluntários saudáveis diluídas para 1×10^7 /ml
Complemento	Soro de coelho bebê diluído de 1% a 10% de acordo com Lote de soro
Soro de Teste	Soro obtido após a última imunização, descomplementado e serialmente diluído de 1:20 a 1:2.000.000

Exemplo 40Estudos de mecanismo imune (*in vivo*)

Em outro exemplo, o mecanismo imune através do qual proteínas de vacina conferem proteção a camundongos será avaliado. Esses experimentos podem incluir dois tipos: (1) usando camundongos de inativação de gene em experimentos de provocação de vacina para determinar se componentes imuno específicos são necessários para proteção; e (2) experimentos de transferência adotiva, onde células imunes de camundongos doadores imunizados são transferidas para recipientes puros para provoca-

ção bacteriana a fim de testar se os componentes transferidos são suficientes para conferir proteção.

Para exemplos envolvendo experimentos de provocação de vacina em camundongos de inativação de gene, os camundongos podem ser comprados de vendedores comerciais e podem incluir várias linhagens bem caracterizadas tais como, por exemplo, inativações de célula B (μ MT), inativações de célula T ($TCR\alpha$), e uma variedade de inativações de citocina, tais como $IFN-\gamma$, $IL-1\alpha$, $TNF\alpha$, $IL-17$, etc). Os camundongos podem ser imunizados conforme descrito no Exemplo 3 e então provocados com *S. aureus*, conforme descrito no exemplo 5. O uso de camundongos do tipo selvagem com a mesma base genética (Balb/c) pode prover controles adequados para medir o efeito da inativação sobre proteção mediada por vacina contra *S. aureus*. Por exemplo, se os camundongos inativados em célula B vacinados morrerem mais rapidamente, ou em números maiores com relação aos camundongos controle vacinados em resposta à provocação bacteriana, pode ser concluído que células B (ou seus produtos) são importantes para a proteção mediada por vacina contra *S. aureus*. Essas estratégias são prática padrão no campo para medição de contribuições de vários componentes imunes para proteção de vacina (Spellberg, 2008; Lin, 2009).

Para exemplos envolvendo transferência adotiva de componentes imunes, camundongos doadores Balb/c do tipo selvagem podem ser imunizados conforme descrito no Exemplo 3 a fim de gerar tecido para transferência adotiva. Esses camundongos podem ser eutanizados 2-4 semanas após a segunda imunização e o sangue coletado através de punção cardíaca e tecido linfóide secundário (nós linfáticos e baço) coletado. Os nós linfáticos coletados podem incluir: axilar, braquial, mesentérico, inguinal, superficial, cervical, cervical profundo e lombar. Soro pode ser isolado do sangue usando metodologia padrão, tais como separadores de soro baseado em centrifugação, e então transferido de volta para um conjunto separado de camundongos recipientes através de injeção intravenosa ou intraperitoneal. O uso de 1-3 camundongos doadores por recipiente é uma razão razoável para transferência de soro e pode ocorrer em volumes de até 0,5 ml. Ainda,

células T de tecido linfóide de doador podem ser purificadas usando anticorpos e tecnologia de enriquecimento de conta magnética (Miltenyi Biotec) que é prática padrão no campo. É típico atingir 95-99% de pureza celular usando esses métodos, conforme avaliado através de tingimento das proteínas da superfície celular com anticorpos para marcadores de linhagem específicos e exame das células através de citometria de fluxo. As populações de célula de interesse (por exemplo, células T CD4⁺, células T CD8⁺, etc) podem ser transferidas de volta para animais recipientes através de injeção intravenosa (entre 2.000.000 e 5.000.000 células T por recipiente). Camundongos recipientes podem receber células T (ou subconjuntos de células T), soro imune ou ambos.

Como controle negativo, animais imunizados com placebo podem ser também usados para isolamento de soro e célula T seguido por transferência de volta para recipientes puros. Como para um controle positivo, um grupo de recipientes que fica imunizado com a vacina de proteção padrão pode ser incluído a fim de prover uma varredura de linha de base de eficácia de proteção quando da provocação bacteriana.

Uma vez os camundongos recipientes tendo recebido várias células ou soros transferidos, eles podem ser provocados com *S. aureus* conforme descrito no Exemplo 5. Com base na porcentagem de morte e na taxa de morte, a contribuição relativa de vários componentes imunes para proteção de vacina pode ser avaliada. Por exemplo, se recipientes que foram administrados com células T a partir de doadores vacinados são protegidos contra provocação na mesma taxa que o controle positivo, pode ser concluído que células T são suficientes para proteção mediada por vacina. Esta estratégia experimental é prática padrão no campo para varredura dos mecanismos imunológicos de vacinas (Spellberg, 2008; Lin 2009).

Exemplo 41

Ensaio de inibição de absorção de ferro

Para avaliação de se anticorpos direcionados contra componentes SIRP inibem crescimento celular através do bloqueio da absorção de ferro, um ensaio de absorção/transporte de ferro pode ser realizado usando

células bacterianas que são pré-incubadas com antissoro anti-SIRP. Células de *S. aureus* de qualquer linhagem são cultivadas da noite para o dia em meios quelatados ou ricos em ferro. As células são subculturadas nos mesmos meios e cultivadas para fase log média até final, peletizadas e incubadas com antissoro anti-SIRP ou antissoro controle em PBS por até uma hora. As células foram então coletadas através de filtração usando filtros de 0,45 µm, então ressuspensas em meio mínimo tratado com Chelex-100 para eliminar ferro ambiental. As células são agitadas rapidamente. Nesse ínterim, uma fonte de ferro (por exemplo, ferrichrome) é misturada com $^{55}\text{FeCl}_2$ radiomarcado (ou outra molécula de ferro radiomarcada) com ácido nitrilotriacético e deixada incubar por vários minutos.

Para iniciar a absorção de ferro, uma alíquota pequena (por exemplo 10 µl) da mistura de ferro radiomarcada foi adicionada às células (em um volume de 1 ml) em um tubo de cultura livre de Fe. O tubo foi incubado com vortexação e amostragem periódicas de alíquotas filtradas em filtros de membrana e lavadas com LiCl. Seguindo secagem, as membranas são contadas em fluido de cintilação para quantificar a absorção de ferro. As células pré-incubadas com antissoro anti-SIRP devem ser mais lentas para absorver ferro do que células pré-incubadas com antissoro controle (Sebulsky, 2000; Goel, 2001).

Exemplo 42

Protocolo de purificação de proteína de alto rendimento

Em alguns casos, rSIRPS recombinantes foram purificadas usando um método de alto rendimento. Este método é otimizado para rendimentos maiores e pureza maior do polipeptídeo. O método é realizado através de ressuspensão do pélete bacteriano contendo o polipeptídeo produzido recombinante em Tris 20 mM, pH 9; NaCl 300 mM complementado com lisozima (100 µg/ml final) e MgCl_2 (1 mM final). A amostra é então incubada com oscilação leve por 15 minutos a 4° C. Após 15 minutos, 1 U/ml de benzoato é adicionado e a amostra é incubada por uma hora em temperatura ambiente. O lisato solúvel obtido após centrifugação (20.000 x g, 20 minutos a 4° C) deve ser filtrado com um filtro de 0,45 µm e adicionado a uma coluna

de gravidade de 5 ml equilibrada revestida com resina de ligação de níquel-His (Novagen 69670-4, EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ). A purificação da proteína N-His₆ é realizada seguindo as instruções do fabricante. A purificação da proteína N-His₆ é finalizada usando uma coluna de exclusão de tamanho de grau prep Superdex 75 HiLoad 26/60 (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ). A coluna é equilibrada com Tris 20 mM, pH 9; NaCl 300 mM usando um BioCAD FPLC (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) e 15 ml da amostra de proteína são carregados na coluna HiLoad em uma taxa de fluxo de 1,5 ml/min. A amostra é eluída seguindo 3,5 horas de tempo de atividade em uma taxa de fluxo de 1,8 ml/min usando Tris 20 mM, pH 9; NaCl 300 mM como a fase móvel.

O polipeptídeo é quantificado usando uma versão modificada do procedimento BCA (Thermo Fisher Scientific, Inc., Rockford, IL) onde dodecil sulfato de sódio 15% (SDS), ureia 8M e 3-([3-Colamidopropil]dimetilamonio)-2-hidróxi-1-propanossulfonato (CHAPS) 2,5% são usados para assegurar solubilidade completa de toda a proteína dentro da amostra. O ensaio também consiste em SDS 5% adicionado ao reagente de trabalho BCA para manter solubilidade da proteína durante a fase reativa de BCA. A leitura e a análise de BCA são realizadas de acordo com a literatura do produto.

Para análise densitométrica, 3,0 µg de antígeno de produto final foram quantificados quanto à pureza usando SDS PAGE 10%, tingidos com coomassie e imagem feita usando um *scanner* ODYSSEY (LiCor Biosciences, Lincoln, NE). O gel tingido foi varrido e as áreas dos componentes principais foram determinadas com relação à área total. Endotoxina residual foi removida usando um kit blue one/endosafe Endotrap (Hyglos GmbH, Regensburg, Alemanha). A batelada final é armazenada com uma faixa de concentração de 1,0 mg/ml a 4,0 mg/ml em tampão de armazenamento de PBS em menos do que -70° C em alíquotas apropriadas.

O relatório completo de todas as patentes, pedidos de patente, e publicações, e material eletronicamente disponível (incluindo, por exemplo, submissões de sequência de nucleotídeo em, por exemplo, GenBank e RefSeq, e submissões de sequência de aminoácido na, por exemplo, SwissProt,

PIR, PRF, PDB e traduções de regiões de codificação anotadas em GenBank e RefSeq) citados aqui são incorporados a título de referência. No caso de qualquer inconsistência existir entre o relatório do presente pedido e o(s) relatório(s) de qualquer documento incorporado aqui a título de referência, o

5 relatório do presente pedido deve prevalecer. A descrição detalhada e os exemplos acima foram dados para clareza de compreensão apenas. Quaisquer limitações desnecessárias devem ser compreendidas a partir deles. A invenção não deve ser limitada aos detalhes exatos mostrados e descritos, uma vez que variações óbvias a um versado na técnica serão incluídas na

10 invenção definida pelas reivindicações.

A menos que de outro modo indicado, todos os números expressando quantidades de componentes, pesos moleculares e outros usados no relatório e nas reivindicações devem ser compreendidos como sendo modificados em todos os casos pelo termo "cerca de". Desta maneira, a menos

15 que de outra maneira indicado o contrário, os parâmetros numéricos mostrados no relatório e nas reivindicações são aproximações que podem variar dependendo das propriedades desejadas que pretendem ser obtidas pela presente invenção. No mínimo, e não como uma tentativa de limitar a doutrina de equivalentes do escopo das reivindicações, cada parâmetro numérico

20 deve ser pelo menos considerado à luz do número de dígitos significantes relatados e através da aplicação de técnicas de arredondamento comuns.

Sem importar que as faixas numéricas e parâmetros mostrando o escopo amplo da invenção sejam aproximações, os valores numéricos mostrados nos exemplos específicos são relatados o mais precisamente

25 possível. Todos os valores numéricos, no entanto, contêm inerentemente uma faixa necessariamente resultante do desvio padrão encontrado em suas respectivas medições de teste.

Todos os cabeçalhos são para a conveniência do leitor e não devem ser usados para limitar o significado do texto que segue o cabeçalho,

30 a menos que especificado.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição compreendendo:

um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 92% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:397, contanto
5 que se o polipeptídeo isolado incluir um ou mais aminoácidos adicionais no terminal amino, o um ou mais aminoácidos adicionais incluam pelo menos uma deleção de aminoácido ou pelo menos uma substituição de aminoácido comparado com os aminoácidos 1-26 da SEQ ID NO:399.

2. Composição compreendendo:

10 um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 98% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:408, contanto que se o polipeptídeo isolado incluir um ou mais aminoácidos adicionais no terminal amino, o um ou mais aminoácidos adicionais incluam pelo menos uma deleção de aminoácido ou pelo menos uma substituição de aminoácido
15 comparado com os aminoácidos 1-5 da SEQ ID NO:415.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, onde a composição protege um animal contra provocação com uma *S. aureus* selecionada da ATCC 19636 ou ATCC 25904.

4. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 1 ou
20 reivindicação 2 compreendendo ainda um carreador farmacêuticamente aceitável.

5. Composição de acordo com a reivindicação 1, onde o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 95% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID
25 NO:397.

6. Composição de acordo com a reivindicação 1, onde o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 92% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:397.

30 7. Composição de acordo com a reivindicação 6, onde o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 95% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID

NO:397.

8. Composição de acordo com a reivindicação 2, onde o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 98% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID

5 NO:397.

9. Composição de acordo com a reivindicação 2, onde o polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 98% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:408.

10 10. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2 compreendendo ainda pelo menos um segundo polipeptídeo, onde o segundo polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro e não-isolável quando cultivado nos meios sem o quelante de ferro.

15 11. Composição de acordo com a reivindicação 10, onde o segundo polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de similaridade com a sequência de aminoácido de qualquer uma da: SEQ ID NO:353, SEQ ID NO:354, SEQ ID NO:355, SEQ ID NO:356, SEQ ID NO:357, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:360, SEQ ID NO:361, SEQ ID NO:362, SEQ ID NO:363, SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:365, SEQ ID NO:366, SEQ ID NO:367, SEQ ID NO:368, SEQ ID NO:369, SEQ ID NO:370, SEQ ID NO:371, SEQ ID NO:372, SEQ ID NO:373, SEQ ID NO:374, SEQ ID NO:375, SEQ ID NO:376, SEQ ID NO:377, SEQ ID NO:378, SEQ ID NO:379, SEQ ID NO:380, SEQ ID NO:381, SEQ ID NO:382, SEQ ID NO:383, SEQ ID NO:384, SEQ ID NO:385, SEQ ID NO:386, SEQ ID NO:387, SEQ ID NO:388, SEQ ID NO:389, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:391, SEQ ID NO:392, SEQ ID NO:393, SEQ ID NO:394, SEQ ID NO:395, SEQ ID NO:396 SEQ ID NO:419, SEQ ID NO:420, SEQ ID NO:421, SEQ ID NO:422, SEQ ID NO:423, SEQ ID NO:424, SEQ ID NO:425, SEQ ID NO:426, SEQ ID NO:427, SEQ ID NO:428 ou SEQ ID NO:429.

12. Composição de acordo com a reivindicação 1 compreenden-

do ainda pelo menos um segundo polipeptídeo, onde o segundo polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de metal, não é isolável quando cultivado nos meios sem o quelante de metal e compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de similaridade com a sequência de aminoácido de qualquer um de: SEQ ID NO:408, SEQ ID NO:409, SEQ ID NO:410, SEQ ID NO:411, SEQ ID NO:412, SEQ ID NO:413, SEQ ID NO:414, SEQ ID NO:415, SEQ ID NO:416, SEQ ID NO:417 ou SEQ ID NO:418.

13. Composição de acordo com a reivindicação 12, onde o segundo polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de identidade com a sequência de aminoácido de qualquer uma das: SEQ ID NO:408, SEQ ID NO:409, SEQ ID NO:410, SEQ ID NO:411, SEQ ID NO:412, SEQ ID NO:413, SEQ ID NO:414, SEQ ID NO:415, SEQ ID NO:416, SEQ ID NO:417 ou SEQ ID NO:418.

14. Composição de acordo com a reivindicação 2 compreendendo ainda pelo menos um segundo polipeptídeo, onde o segundo polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro, não é isolável quando cultivado em meios sem o quelante de ferro e compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de similaridade com a sequência de aminoácido de qualquer uma das: SEQ ID NO:397, SEQ ID NO:398, SEQ ID NO:399, SEQ ID NO:400, SEQ ID NO:401, SEQ ID NO:402, SEQ ID NO:403, SEQ ID NO:404, SEQ ID NO:405, SEQ ID NO:406 ou SEQ ID NO:407.

15. Composição de acordo com a reivindicação 14, onde o segundo polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de identidade com a sequência de aminoácido de qualquer uma das: SEQ ID NO:397; SEQ ID NO:398, SEQ ID NO:399, SEQ ID NO:400, SEQ ID NO:401, SEQ ID NO:402, SEQ ID NO:403, SEQ ID NO:404; SEQ ID NO:405, SEQ ID NO:406 ou SEQ ID NO:407.

16. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2 compreendendo ainda:

um polipeptídeo isolado é isolável de uma *S. aureus* quando cul-

tivado em meios sem o quelante de ferro e tem um peso molecular de 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41, kDa, 40 kDa; ou

uma combinação de tais polipeptídeos isolados.

5 17. Método para tratamento de uma infecção em um indivíduo, o método compreendendo:

administração de uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo tendo ou sob risco de ter uma infecção causada por *Staphylococcus* spp., onde a composição compreende:

10 um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:397.

18. Método para tratamento de um sintoma em um indivíduo, o método compreendendo:

15 administração de uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo tendo uma infecção causada por *Staphylococcus* spp., onde a composição compreende:

um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:397.

20 19. Método para tratamento de uma infecção em um indivíduo, o método compreendendo:

administração de uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo tendo ou sob risco de ter uma infecção causada por *Staphylococcus* spp., onde a composição compreende:

25 um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:397.

20. Método para tratamento de uma infecção em um indivíduo, o método compreendendo:

30 administração de uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo tendo ou sob risco de ter uma infecção causada por *Staphylococcus* spp., onde a composição compreende:

um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:408.

21. Método para tratamento de um sintoma em um indivíduo, o método compreendendo:

administrar uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo tendo uma infecção causada por *Staphylococcus* spp., onde a composição compreende:

um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:408.

22. Método para tratamento de uma infecção em um indivíduo, o método compreendendo:

administrar uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo tendo ou sob risco de ter uma infecção causada por *Staphylococcus* spp., onde a composição compreende:

um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:408.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-22, onde a composição compreende ainda pelo menos um segundo polipeptídeo, onde o segundo polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro e não-isolável quando cultivado nos meios sem o quelante de ferro.

24. Método de acordo com a reivindicação 23, onde o segundo polipeptídeo tem um peso molecular conforme determinado através de eletroforese em um gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio de 88 kDa, 55 kDa, 38 kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa ou 33 kDa.

25. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-22, onde a composição compreende ainda pelo menos um segundo polipeptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de similaridade com a sequência de aminoácido de qualquer uma de: SEQ ID NO:353, SEQ ID NO:354, SEQ ID NO:355, SEQ ID NO:356, SEQ ID NO:357, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:360, SEQ ID NO:361, SEQ ID NO:362, SEQ ID NO:363, SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:365, SEQ ID NO:366, SEQ ID NO:367, SEQ ID NO:368, SEQ ID NO:369, SEQ ID NO:370, SEQ ID NO:371, SEQ ID NO:372, SEQ ID

NO:373, SEQ ID NO:374, SEQ ID NO:375, SEQ ID NO:376, SEQ ID NO:377, SEQ ID NO:378, SEQ ID NO:379, SEQ ID NO:380, SEQ ID NO:381, SEQ ID NO:382, SEQ ID NO:383, SEQ ID NO:384, SEQ ID NO:385, SEQ ID NO:386, SEQ ID NO:387, SEQ ID NO:388, SEQ ID NO:389, SEQ ID NO:390, SEQ ID NO:391, SEQ ID NO:392, SEQ ID NO:393, SEQ ID NO:394, SEQ ID NO:395, SEQ ID NO:396 SEQ ID NO:419, SEQ DD NO:420, SEQ ID NO:421, SEQ ID NO:422, SEQ ID NO:423, SEQ ID NO:424, SEQ ID NO:425, SEQ ID NO:426, SEQ ID NO:427, SEQ ID NO:428 ou SEQ ID NO:429.

10 26. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-19, onde a composição compreende ainda pelo menos um segundo polipeptídeo, onde o segundo polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro, não é isolável quando cultivado nos meios sem o quelante de ferro e compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de similaridade com a sequência de aminoácido de qualquer uma da: SEQ ID NO:408, SEQ ID NO:409, SEQ ID NO:410, SEQ ID NO:411, SEQ ID NO:412, SEQ ID NO:413, SEQ ID NO:414, SEQ ID NO:415, SEQ ID NO:416, SEQ ID NO:417 ou SEQ ID NO:418.

20 27. Método de acordo com a reivindicação 26, onde o segundo polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de identidade com a sequência de aminoácido de qualquer uma da: SEQ ID NO:408, SEQ ID NO:409, SEQ ID NO:410, SEQ ID NO:411, SEQ ID NO:412, SEQ ID NO:413, SEQ ID NO:414, SEQ ID NO:415, SEQ ID NO:416, SEQ ID NO:417 ou SEQ ID NO:418.

25 28. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 20-22, onde a composição compreende ainda pelo menos um segundo polipeptídeo, onde o segundo polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro, não é isolável quando cultivado nos meios sem o quelante de ferro e compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de similaridade com a sequência de aminoácido de qualquer uma da: SEQ ID NO:397, SEQ

ID NO:398, SEQ ID NO:399, SEQ ID NO:400, SEQ ID NO:401, SEQ ID NO:402, SEQ ID NO:403, SEQ ID NO:404, SEQ ID NO:405, SEQ ID NO:406 ou SEQ ID NO:407.

29. Método de acordo com a reivindicação **29**, onde o segundo
5 polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de identidade com a sequência de aminoácido de qualquer uma das: SEQ ID NO:397, SEQ ID NO:398, SEQ ID NO:399, SEQ ID NO:400, SEQ ID NO:401, SEQ ID NO:402, SEQ ID NO:403, SEQ ID NO:404, SEQ ID NO:405, SEQ ID NO:406 ou SEQ ID NO:407.

10 30. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-22, onde a composição compreende ainda:

um polipeptídeo isolado que é isolável de uma *S. aureus* quando cultivado em meios sem um quelante de ferro e tem um peso molecular conforme determinado através de eletroforese em um gel de poliacrilamida-
15 dodecil sulfato de sódio de 150 kDa, 132 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa, 40 kDa, ou

uma combinação de tais polipeptídeos isolados.

31. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-22, onde o indivíduo é um mamífero.

20 32. Método de acordo com a reivindicação 31, onde o mamífero é um humano.

33. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 17-22, onde a *Staphylococcus* spp. é *S. aureus*.

25 34. Método para tratamento de uma infecção em um indivíduo, o método compreendendo:

administração de uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo tendo ou sob risco de ter uma infecção causada por *Staphylococcus* spp., onde a composição compreende:

30 anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:397.

35. Método para tratamento de uma infecção em um indivíduo

compreendendo:

administração de uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo tendo uma infecção causada por *Staphylococcus* spp., onde a composição compreende:

5 anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:397.

36. Método para diminuição da colonização em um indivíduo, o método compreendendo:

10 administrar uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo colonizado por uma *Staphylococcus* spp., onde a composição compreende:

um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:397.

15 37. Método para tratamento de uma infecção em um indivíduo, o método compreendendo:

administrar uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo tendo ou sob risco de ter uma infecção causada por *Staphylococcus* spp., onde a composição compreende:

20 anticorpo que liga especificamente um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:408.

38. Método para tratamento de um sintoma em um indivíduo compreendendo:

25 administrar uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo tendo uma infecção causada por *Staphylococcus* spp., onde a composição compreende:

30 anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:408.

39. Método para diminuição da colonização em um indivíduo, o método compreendendo:

administrar uma quantidade eficaz de uma composição a um indivíduo colonizado por uma *Staphylococcus* spp., onde a composição compreende:

um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:408.

40. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-39, onde a composição compreende ainda anticorpo que se liga especificamente a pelo menos um segundo polipeptídeo, onde o segundo polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro e não-isolável quando cultivado nos meios sem o quelante de ferro.

41. Método de acordo com a reivindicação 40, onde o segundo polipeptídeo tem um peso molecular conforme determinado através de eletroforese em um gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio de 88 kDa, 55 kDa, 38kDa, 37 kDa, 36 kDa, 35 kDa ou 33 kDa.

42. Método de acordo com a reivindicação 40, onde o segundo polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de similaridade com a sequência de aminoácido de qualquer uma das: SEQ ID NO:353, SEQ ID NO:354, SEQ ID NO:355, SEQ ID NO:356, SEQ ID NO:357, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:360, SEQ ID NO:361, SEQ ID NO:362, SEQ ID NO:363, SEQ ID NO:364, SEQ ID NO:365, SEQ ID NO:366, SEQ ID NO:367, SEQ ID NO:368, SEQ ID NO:369, SEQ ID NO:370, SEQ ID NO:371, SEQ ID NO:372, SEQ ID NO:373, SEQ ID NO:374, SEQ ID NO:375, SEQ ID NO:376, SEQ ID NO:377, SEQ ID NO:378, SEQ ID NO:379, SEQ ID NO:380, SEQ ID NO:381, SEQ ID NO:382, SEQ ID NO:383, SEQ ID NO:384, SEQ ID NO:385, SEQ ID NO:386, SEQ ED NO:387, SEQ ID NO:388, SEQ ID NO:389, SEQ ED NO:390, SEQ ID NO:391, SEQ ID NO:392, SEQ ID NO:393, SEQ ED NO:394, SEQ ED NO:395, SEQ ID NO:396, SEQ ID NO:419, SEQ ID NO:420, SEQ ID NO:421, SEQ ID NO:422, SEQ ID NO:423, SEQ ED NO:424, SEQ ID NO:425, SEQ ID NO:426, SEQ ID NO:427, SEQ ID NO:428 ou SEQ ID NO:429.

43. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-36, onde a composição compreende ainda anticorpo que se liga especificamente a pelo menos um segundo polipeptídeo, onde o segundo polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro, não é isolável quando cultivado em meios sem o quelante de ferro e compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de similaridade com a sequência de aminoácido de qualquer uma da: SEQ ID NO:408, SEQ ID NO:409, SEQ ID NO:410, SEQ ID NO:411, SEQ ID NO:412, SEQ ID NO:413, SEQ ID NO:414, SEQ ID NO:415, SEQ ID NO:416, SEQ ID NO:417 ou SEQ ID NO:418.

44. Método de acordo com a reivindicação 43, onde o segundo polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de identidade com a sequência de aminoácido de qualquer uma da: SEQ ID NO:408, SEQ ID NO:409, SEQ ID NO:410, SEQ ID NO:411, SEQ ID NO:412, SEQ ID NO:413, SEQ ID NO:414, SEQ ID NO:415, SEQ ID NO:416, SEQ ID NO:417 ou SEQ ID NO:418.

45. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 37-39, onde a composição compreende ainda anticorpo que se liga especificamente a pelo menos um segundo polipeptídeo, onde o segundo polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro, não é isolável quando cultivado nos meios sem o quelante de ferro e compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de similaridade com a sequência de aminoácido de qualquer uma da: SEQ ID NO:397, SEQ ED NO:398, SEQ ID NO:399, SEQ ID NO:400, SEQ ID NO:401, SEQ ID NO:402, SEQ ID NO:403, SEQ ID NO:404, SEQ ID NO:405, SEQ DD NO:406 ou SEQ ID NO:407.

46. Método de acordo com a reivindicação 45, onde o segundo polipeptídeo compreende uma sequência de aminoácido tendo pelo menos 85% de similaridade com a sequência de aminoácido de qualquer uma da: SEQ ID NO:397, SEQ ID NO:398, SEQ ID NO:399, SEQ ID NO:400, SEQ ID NO:401, SEQ ID NO:402, SEQ ID NO:403, SEQ ID NO:404, SEQ ID NO:405, SEQ ID NO:406 ou SEQ ID NO:407.

47. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-39, onde a composição compreende ainda:

5 anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo que é isolável de uma *S. aureus* quando cultivado em meios sem um quelante de metal e tem um peso molecular conforme determinado através de eletroforese em um gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio de 150 kDa, 292 kDa, 120 kDa, 75 kDa, 58 kDa, 50 kDa, 44 kDa, 43 kDa, 41 kDa, 40 kDa; ou uma combinação de tais polipeptídeos isolados.

10 48. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-39, onde o indivíduo é um mamífero.

49. Método de acordo com a reivindicação 48, onde o mamífero é um humano.

50. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-39, onde a *Staphylococcus spp.* é *S. aureus*.

15 51. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-39, onde o anticorpo é anticorpo policlonal.

52. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-39, onde o anticorpo é anticorpo policlonal.

20 53. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 34-39, onde o anticorpo é anticorpo monoclonal.

54. Estojo para detecção de anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo compreendendo em recipientes separados:

25 um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 80% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID NO:408 ou SEQ ID NO:397; e

um reagente que detecta um anticorpo que se liga especificamente ao polipeptídeo.

30 55. Método de acordo com a reivindicação 24 ou 41, onde o polipeptídeo isolado com um peso molecular de 88 kDa tem uma impressão digital de massa de pelo menos 80% de similaridade com uma impressão digital de massa de um polipeptídeo de 88 kDa expresso por *Staphylococcus aureus* linhagem ATCC 19636 e onde o polipeptídeo

é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro e não-isolável quando cultivado em meios sem o quelante de ferro;

5 onde o polipeptídeo isolado com um peso molecular de 55 kDa tem uma impressão digital de massa de pelo menos 80% de similaridade com uma impressão digital de massa de polipeptídeo de 55 kDa expresso por *Staphylococcus aureus* linhagem ATCC 19636, e onde o polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado nos meios compreendendo um quelante de ferro e não-isolável quando cultivado em meios
10 sem o quelante de ferro;

onde o polipeptídeo isolado com um peso molecular de 38 kDa tem uma impressão digital de massa de pelo menos 80% de similaridade com uma impressão digital de massa de um polipeptídeo de 38 kDa expresso por *Staphylococcus aureus* linhagem ATCC 19636 e onde o polipeptídeo
15 é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro e não-isolável quando cultivado em meios sem o quelante de ferro;

onde o polipeptídeo isolado com um peso molecular de 37 kDa tem uma impressão digital de massa de pelo menos 80% de similaridade com uma impressão digital de massa de um polipeptídeo de 37 kDa expresso por *Staphylococcus aureus* linhagem ATCC 19636 e onde o polipeptídeo
20 é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro e não-isolável quando cultivado em meios sem o quelante de ferro;

25 onde o polipeptídeo isolado com um peso molecular de 36 kDa tem uma impressão digital de massa de pelo menos 80% de similaridade com uma impressão digital de massa de um polipeptídeo de 36 kDa expresso por *Staphylococcus aureus* linhagem ATCC 19636 e onde o polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios
30 compreendendo um quelante de ferro e não-isolável quando cultivado em meios sem o quelante de ferro;

onde o polipeptídeo isolado com um peso molecular de 35 kDa

tem uma impressão digital de massa de pelo menos 80% de similaridade com uma impressão digital de massa de um polipeptídeo de 35 kDa expresso por *Staphylococcus aureus* linhagem ATCC 19636 e onde o polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro e não-isolável quando cultivado em meios sem o quelante de ferro;

5 onde o polipeptídeo isolado com um peso molecular de 33 kDa tem uma impressão digital de massa de pelo menos 80% de similaridade com uma impressão digital de massa de um polipeptídeo de 33 kDa expresso por *Staphylococcus aureus* linhagem ATCC 19636 e onde o polipeptídeo é isolável de uma *Staphylococcus aureus* quando incubado em meios compreendendo um quelante de ferro e não-isolável quando cultivado em meios sem o quelante de ferro,

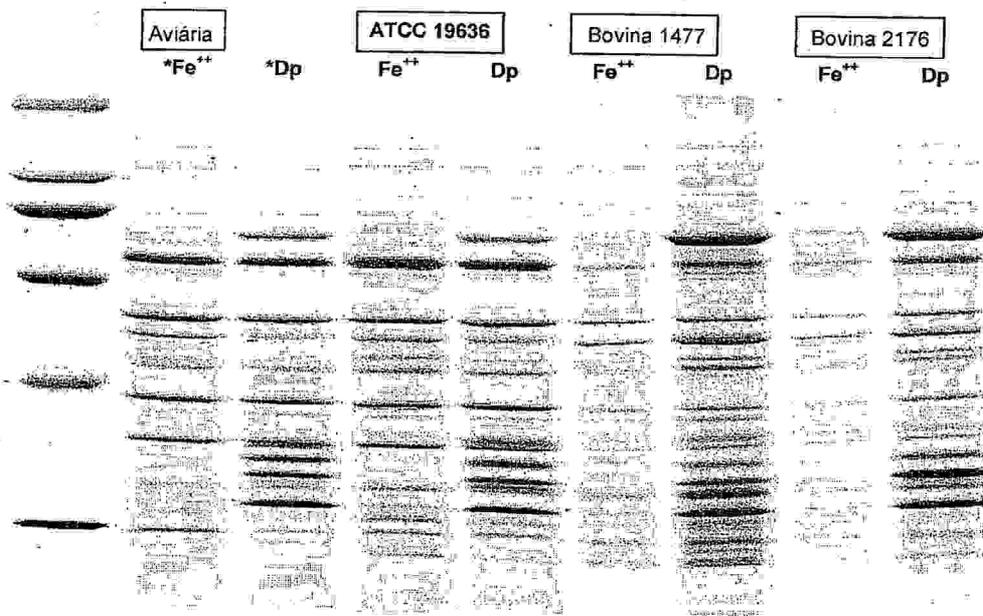
56. Composição compreendendo:

15 anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 92% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:397, contanto que se o polipeptídeo isolado incluir um ou mais aminoácidos adicionais no terminal amino, os um ou mais aminoácidos adicionais incluam pelo menos uma deleção de aminoácido ou pelo menos uma substituição de aminoácido comparado com os aminoácidos 1-26 da SEQ ID NO:399.

57. Composição compreendendo:

25 anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo isolado tendo pelo menos 98% de similaridade de sequência com a sequência de aminoácido de SEQ ID NO:408, contanto que se o polipeptídeo isolado incluir um ou mais aminoácidos adicionais no terminal amino, os um ou mais aminoácidos adicionais incluam pelo menos uma deleção de aminoácido ou pelo menos uma substituição de aminoácido comparado com os aminoácidos 1-5 de SEQ ID NO:415.

FIG. 1



*Fe⁺⁺ As bactérias cultivadas na presença de cloreto férrico (Fe⁺⁺)

*Dp As bactérias cultivadas na presença de um quelante de ferro (2,2 dipiridínica (Dp))

FIG. 2

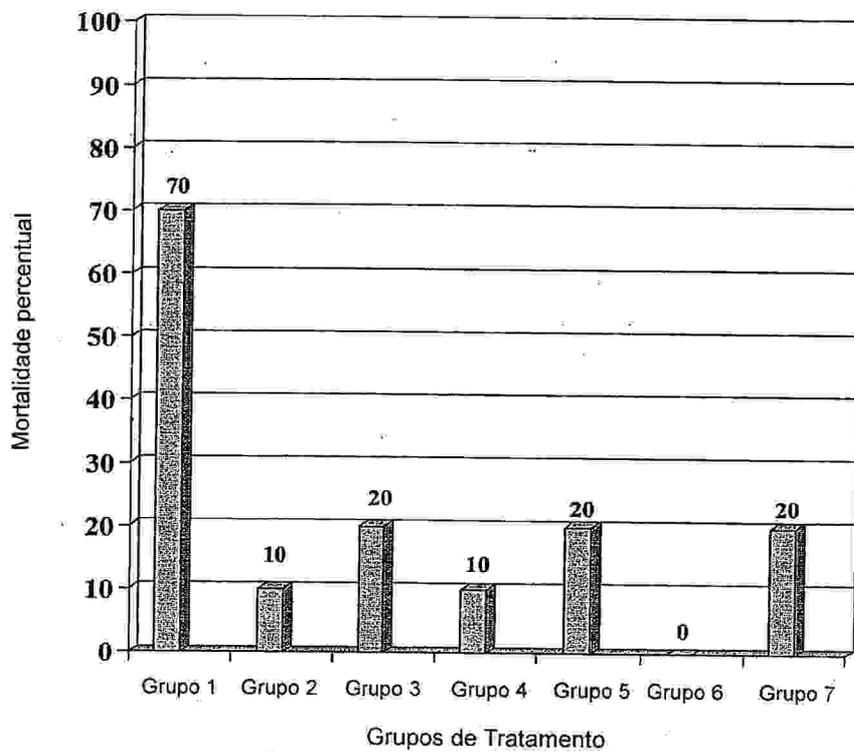


FIG. 3

Curva de sobrevivência Kaplan-Meier mostrando sobrevivência percentual após vacinação e provocação homóloga com *S. aureus* ATCC19636

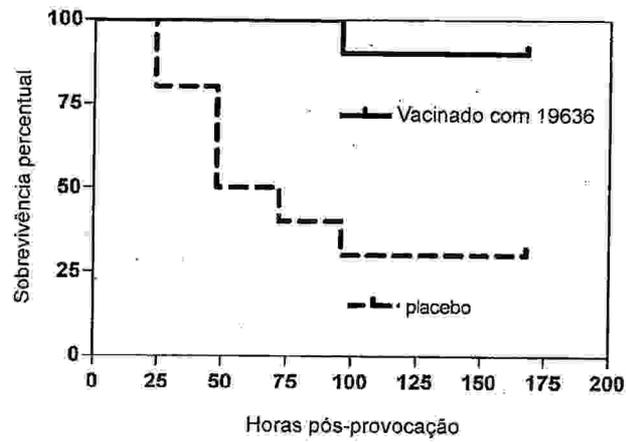
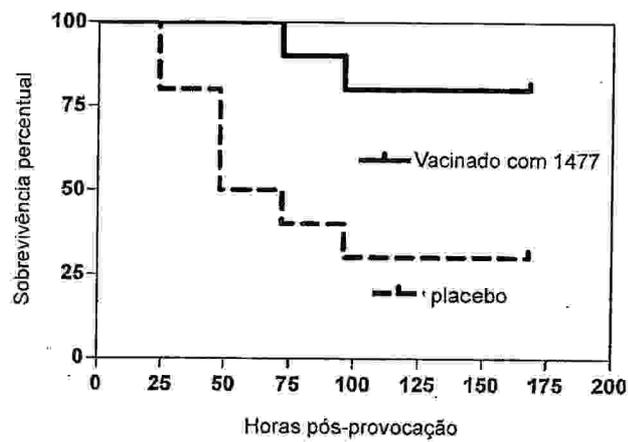


FIG. 4

Curva de sobrevivência Kaplan-Meier mostrando sobrevivência percentual após vacinação e provocação homóloga com *S. aureus* ATCC19636



4/112

FIG. 5

Curva de sobrevivência Kaplan-Meier mostrando sobrevivência percentual após imunização passiva e provocação homóloga com *S. aureus* ATCC19636

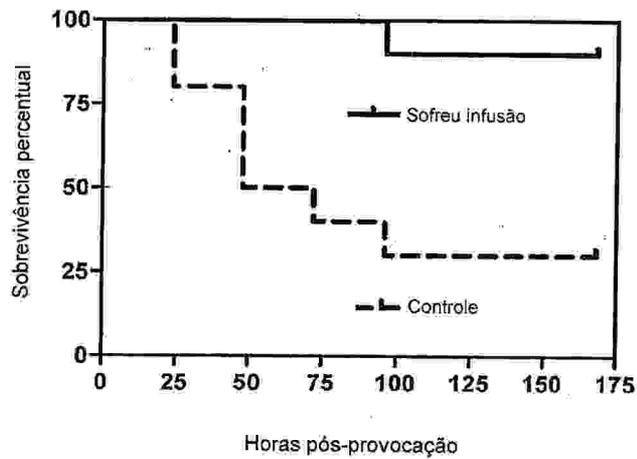


FIG. 6

Curva de sobrevivência Kaplan-Meier mostrando sobrevivência percentual após imunização passiva e provocação homóloga com *S. aureus* ATCC19636

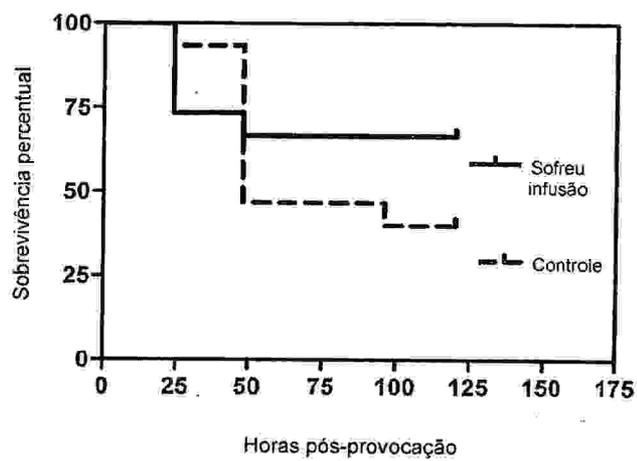


FIG. 7

LETNKNHATAWQGFKNRWRNRHVDVREFIQLNYTLYEGNDSFLAGPTEATSKL
 WEQVMQLSKEERERGGMWDMDTKVASTITSHDAGYLDKDLETIVGVQTEKPFK
 RSMQPFGGIRMAKAACEAYGYELDEETEKIFTDYRKTHNQGVFDAYSREMLNCR
 KAGVITGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGVDFLMEEKMHDFNTMSTEMSEDVIRL
 REELSEQYRALKELKELGQKYGFDLSRPAENFKEAVQWLYLAYLAAIKEQNGAA
 MSLGRTSTYLDIYAERDLKAGVITSEVQEIIDHFIMKLRIVKFARTPDYNELFSGD
 PTWVTVSIGGVGIDGRPLVTKNSFRFLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVRLPDNFKTY
 CAKMSIKTSSIQYENDDIMRESYGDDYGIACCVSAVTIGKQMQFFGARANIAKTLL
 YAINGGKDEKSGAQVGPNFEGINSEVLEYDEVFKKFDQMMDWLAGVYINSLNVI
 HYMHDKYSYERIEMALHDTEIVRTMATGIAGLSVAADSLSAIKYAQVKPIRNEEG
 LVVD FEIEGDFPKYGNDDRVDIAVDLVERFMTKLRSHKTYRDSEHTMSVLTIT
 SNVVYVKKTGNTPDGRKAGEPFAPGANPMHGRDQKGALSSLSSVAKIPYDCCKD
 GISNTFSIVPKSLGKEPEDQNRNLTSMLDGYAMQCGHHLNINVFNRRETLIDAMEHP
 EEYPQLTIRVSGYAVNFIKLTREQQLDVISRTFHESM

(SEQ ID NO:353)

FIG. 8

MLETNKNHATAWQGFKNRWRNRHVDVREFIQLNYTLYEGNDSFLAGPTEATSK
 LWEQVMQLSKEERERGGMWDMDTKVASTITSHDAGYLDKDLETIVGVQTEKPF
 KRSMQPFGGIRMAKAACEAYGYELDEETEKIFTDYRKTHNQGVFDAYSREMLNC
 RKAGVITGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGVDFLMEEKMHDFNTMSTEMSEDVIR
 LREELSEQYRALKELKELGQKYGFDLSRPAENFKEAVQWLYLAYLAAIKEQNGA
 AMSLGRTSTFLDIYAERDLKAGVITSEVQEIIDHFIMKLRIVKFARTPDYNELFSG
 DPTWVTVSIGGVGIDGRPLVTKNSFRFLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVRLPDNFKT
 YCAKMSIKTSSIQYENDDIMRESYGDDYGIACCVSAMTIGKQMQFFGARANLAKT
 LLYAINGGKDEKSGAQVGPNFEGINSEVLEYDEVFKKFDQMMDWLAGVYINSLN
 VIHMHDKYSYERIEMALHDTEIVRTMATGIAGLSVAADSLSAIKYAQVKPIRNEE
 GLVVD FEIEGDFPKYGNDDRVDIAVDLVERFMTKLRSHKTYRDSEHTMSVLTIT
 TSNVVYVKKTGNTPDGRKAGEPFAPGANPMHGRDQKGALSSLSSVAKIPYDCCK
 DGISNTFSIVPKSLGKEPEDQNRNLTSMLDGYAMQCGHHLNINVFNRRETLIDAME
 HPEEYPQLTIRVSGYAVNFIKLTREQQLDVISRTFHESM

(SEQ ID NO:354)

FIG. 9

MLETNKNHATAWQGFKNRWRNRHVDVREFIQLNYTLYEGNDSFLAGPTEATSK
LWEQVMQLSKEERERGGMWDMDTKVASTITSHDAGYLDKDLETIVGVQTEKPF
KRSMQPFGGIRMAKAACEAYGYELDEETEKIFTDYRKTHNQGVFDAYSREMLNC
RKAGVITGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGVDFLMEEKMHDFNTMSTEMSEDEVIR
LREELSEQYRALKELKELGQKYGFDLSRPAENFKEAVQWLYLAYLAAIKEQNGA
AMSLGRTSTFLDIYAERDLKAGVITSEVQEIIDHFIMKLRIKVFARTPDYNELFSG
DPTWVTESIGGVGIDGRPLVTKNSFRFLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVRLPDNFKT
YCAKMSIKTSSIQYENDDIMRESYGDDYGIACCVSAMTIGKQMQFFGARANLAKT
LLYAINGGKDEKSGAQVGNPFEGINSEVLEYDEVFKKFDQMMDWLAGVYINSLN
VIHYMHDKYSYERIEALHDTEIVRTMATGIAGLSVAADSLSAIKYAQVKPIRNEE
GLVVDFEIEGDFPKYGNDDRVDIAVDLVERFMTKLRSHKTYRDSEHTMSVLT
TSNVVYGKKTGNTPDGRKAGEPFAPGANPMHGRDQKGALSSLSSVAKIPYDCK
DGISNTFSIVPKSLGKEPEDQNRNLTSMLDGYAMQCGHHLNINVFNRRETLIDAME
HPEEYPQLTIRVSGYAVNFIKLTREQQLDVISRTFHESM
(SEQ ID NO:355)

FIG. 10

MLETNKNHATAWQGFKNRWRNRHVDVREFIQLNYTLYEGNDSFLAGPTEATSK
LWEQVMQLSKEERERGGMWDMDTKVASTITSHDAGYLDKDLETIVGVQTEKPF
KRSMQPFGGIRMAKAACEAYGYELDEETEKIFTDYRKTHNQGVFDAYSREMLNC
RKAGVITGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGVDFLMEEKMHDFNTMSTEMSEDEVIR
LREELSEQYRALKELKELGQKYGFDLSRPAENFKEAVQWLYLAYLAAIKEQNGA
AMSLGRTSTFLDIYAERDLKAGVITSEVQEIIDHFIMKLRIKVFARTPDYNELFSG
DPTWVTESIGGVGIDGRPLVTKNSFRFLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVRLPDNFKT
YCAKMSIKTSSIQYENDDIMRESYGDDYGIACCVSAMTIGKQMQFFGARANLAKT
LLYAINGGKDEKSGAQVGNPFEGINSEVLEYDEVFKKFDQMMDWLAGVYINSLN
VIHYMHDKYSYERIEALHDTEIVRTMATGIAGLSVAADSLSAIKYAQVKPIRNEE
GLVVDFEIEGDFPKYGNDDRVDIAVDLVERFMTKLRSHKTYRDSEHTMSVLT
TSNVVYGKKTGNTPDGRKAGEPFAPGANPMHGRDQKGALSSLSSVAKIPYDCK
DGISNTFSIVPKSLGKEPEDQNRNLTSMLDGYAMQCGHHLNINVFNRRETLIDAME
HPEEYPQLTIRVSGYAVNFIKLTREQQLDVISRTFHESM
(SEQ ID NO:356)

FIG. 11

MLETNKNHATAWQGFKNRWRNRHVDVREFIQLNYTL YEGNDSFLAGPTEATSK
LWEQVMQLSKEERERGGMWDMDTKVASTITSHDAGYLDKDLETIVGVQTEKPF
KRSMQPFGGIRMAKAACEAYGYELDEETEKIFTDYRKTHNQGVFDAYSREMLNC
RKAGVITGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGVDFLMEEKMHDFNTMSTEMSEDVIR
LREELSEQYRALKELKELGQKYGFDLSRPAENFKEAVQWLYLAYLAAIKEQNGA
AMSLGRTSTFLDIYAERDLKAGVITeseVQEIIDHFIMKLRIVKFARTPDYNELFSG
DPTWVTESIGGVGIDGRPLVTKNSFRFLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVRLPDNFKT
YCAKMSIKTSSIQYENDDIMRESYGDDYGIACCVSAMTIGKQMQFFGARANLAKT
LLYAINGGKDEKSGAQVGNPFEGINSEVLEYDEVFKKFDQMMDWLAGVYINSLN
VIHYMHDKYSYERIEMALHDTEIVRTMATGIAGLSVAADSLSAIKYAQVKPIRNEE
GLVVDFEIEGDFPKYGNDDRVDIAVDLVERFMTKLRSHKTYRDSEHTMSVLT
TSNVVYGKKTGNTPDGRKAGEPFAPGANPMHGRDQKGALSSLSVAKIPYDCK
DGISNTFSIVPKSLGKEPEDQNRNLTSMLDGYAMQCGHHLNINVFNRRETLIDAME
HPPEYPQLTIRVSGYAVNFIKLTREQQLDVISRTFHESM
(SEQ ID NO:357)

FIG. 12

MLETNKNHATAWQGFKNRWRNRHVDVREFIQLNYTL YEGNDSFLAGPTEATSK
LWEQVMQLSKEERERGGMWDMDTKVASTITSHDAGYLDKDLETIVGVQTEKPF
KRSMQPFGGIRMAKAACEAYGYELDEETEKIFTDYRKTHNQGVFDAYSREMLNC
RKAGVITGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGVDFLMEEKMHDFNTMSTEMSEDVIR
LREELSEQYRALKELKELGQKYGFDLSRPAENFKEAVQWLYLAYLAAIKEQNGA
AMSLGRTSTFLDIYAERDLKAGVITeseVQEIIDHFIMKLRIVKFARTPDYNELFSG
DPTWVTESIGGVGIDGRPLVTKNSFRFLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVRLPDNFKT
YCAKMSIKTSSIQYENDDIMRESYGDDYGIACCVSAMTIGKQMQFFGARANLAKT
LLYAINGGKDEKSGAQVGNPFEGINSEVLEYDEVFKKFDQMMDWLAGVYINSLN
VIHYMHDKYSYERIEMALHDTEIVRTMATGIAGLSVAADSLSAIKYAQVKPIRNEE
GLVVDFEIEGDFPKYGNDDRVDIAVDLVERFMTKLRSHKTYRDSEHTMSVLT
TSNVVYGKKTGNTPDGRKAGEPFAPGANPMHGRDQKGALSSLSVAKIPYDCK
DGISNTFSIVPKSLGKEPEDQNRNLTSMLDGYAMQCGHHLNINVFNRRETLIDAME
HPPEYPQLTIRVSGYAVNFIKLTREQQLDVISRTFHESM
(SEQ ID NO:358)

FIG. 13

MLETNKNHATAWQGFKNRWRNRHVDVREFIQLNYTLYEGNDSFLAGPTEATSK
 LWEQVMQLSKEERERGGMWDMDTKVASTITSHDAGYLDKDLETIVGVQTEKPF
 KRSMQPFGGIRMAKAACEAYGYELDEETEKIFTDYRKTHNQGVFDAYSREMLNC
 RKAGVITGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGVDFLMEEKMHDFNTMSTEMSESVIR
 LREELSEQYRALKELKELGQKYGFDLSRPAENFKEAVQWLYLAYLAAIKEQNGA
 AMSLGRTSTFLDIYAERDLKAGVITSEVQEIIDHFIMKLRIKVFARTPDYNELFSG
 DPTWVTESIGGVGIDGRPLVTKNSFRFLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVRLPDNFKT
 YCAKMSIKTSSIQYENDDIMRESYGDDYGIACCVSAMTIGKQMFFGARANLAKT
 LLYAINGGKDEKSGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFKKFDQMMDWLAGVYINSLN
 VIHYMHDKYSYERIEALHDTEIVRTMATGIAGLSVAADSLSAIKYAQVKPIRNEE
 GLVVDFEIEGDFPKYGNDDRVDIAVDLVERFMTKLRSHKTYRDSEHTMSVLT
 TSNVVGKKTGNTPDGRKAGEPFAPGANPMHGRDQK GALSSLSSVAKIPYDCCK
 DGISNTFSIVPKSLGKEPEDQNRNLTSMLDGYAMQCGHHLNINVFNRRETLIDAME
 HPEEYPQLTIRVSGYAVNFIKLTREQQLDVISRTFHESM
 (SEQ ID NO:359)

FIG. 14

MLETNKNHATAWQGFKNRWRNRHVDVREFIQLNYTLYEGNDSFLAGPTEATSK
 LWEQVMQLSKEERERGGMWDMDTKVASTITSHDAGYLDKDLETIVGVQTEKPF
 KRSMQPFGGIRMAKAACEAYGYELDEETEKIFTDYRKTHNQGVFDAYSREMLNC
 RKAGVITGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGVDFLMEEKMHDFNTMSTEMSESVIR
 LREELSEQYRALKELKELGQKYGFDLSRPAENFKEAVQWLYLAYLAAIKEQNGA
 AMSLGRTSTFLDIYAERDLKAGVITSEVQEIIDHFIMKLRIKVFARTPDYNELFSG
 DPTWVTESIGGVGIDGRPLVTKNSFRFLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVRLPDNFKT
 YCAKMSIKTSSIQYENDDIMRESYGDDYGIACCVSAMTIGKQMFFGARANLAKT
 LLYAINGGKDEKSGAQVGNFEGINSEVLEYDEVFKKFDQMMDWLAGVYINSLN
 VIHYMHDKYSYERIEALHDTEIVRTMATGIAGLSVAADSLSAIKYAQVKPIRNEE
 GLVVDFEIEGDFPKYGNDDRVDIAVDLVERFMTKLRSHKTYRDSEHTMSVLT
 TSNVVGKKTGNTPDGRKAGEPFAPGANPMHGRDQK GALSSLSSVAKIPYDCCK
 DGISNTFSIVPKSLGKEPEDQNRNLTSMLDGYAMQCGHHLNINVFNRRETLIDAME
 HPEEYPQLTIRVSGYAVNFIKLTREQQLDVISRTFHESM
 (SEQ ID NO:360)

FIG. 15

MLETNKNHATAWQGFKNRWRNRHVDVREFIQLNYTLYEGNDSFLAGPTEATSK
 LWEQVMQLSKEERERGGMWDMDTKVASITSHDAGYLDKDLETIVGVQTEKPF
 KRSMQPFGGIRMAKAAACEAYGYELDEETEKIFTDYRKTHNQGVFDAYSREMLNC
 RKAGVITGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGVDFLMEEKMHDFNTMSTEMSEDVIR
 LREELSEQYRALKELKELGQKYGFDLRPAENFKEAVQWLYLAYLAAIKEQNGA
 AMSLGRTSTFLDIYAERDLKAGVITeseVQEIIDHFIMKLRIVKFARTPDYNELFSG
 DPTWVTESIGGVGIDGRPLVTKNSFRFLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVRLPDNFKT
 YCAKMSIKTSSIQYENDDIMRESYGDDYGIACCVSAMTIGKQMQUFFGARANLAKT
 LLYAINGGKDEKSGAQVGNPFEGINSEVLEYDEVFKKFDQMMDWLAGVYINSLN
 VIHYMHDKYSYERIEMALHDTEIVRTMATGIAGLSVAADSLSAIKYAQVKPIRNEE
 GLVVDFEIEGDFPKYGNNDDRVDDIAVDLVERFMTKLRSHKTYRDSEHTMSVLT
 TSNVYVGKKTGNTPDGRKAGEPFAPGANPMHGRDQKGALSSLSSVAKIPYDCCK
 DGISNTFSIVPKSLGKEPEDQNRNLTSMLDGYAMQCGHHLNINVFNRRETLIDAME
 HPPEYPQLTIRVSGYAVNFIKLTREQQLDVISRTFHESM

(SEQ.ID NO:361)

FIG. 16

MLETNKNHATAWQGFKNRWRNRHVDVREFIQLNYTLYEGNDSFLAGPTEATSK
 LWEQVMQLSKEERERGGMWDMDTKVASITSHDAGYLDKDLETIVGVQTEKPF
 KRSMQPFGGIRMAKAAACEAYGYELDEETEKIFTDYRKTHNQGVFDAYSREMLNC
 RKAGVITGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGVDFLMEEKMHDFNTMSTEMSEDVIR
 LREELSEQYRALKELKELGQKYGFDLRPAENFKEAVQWLYLAYLAAIKEQNGA
 AMSLGRTSTFLDIYAERDLKAGVITeseVQEIIDHFIMKLRIVKFARTPDYNELFSG
 DPTWVTESIGGVGIDGRPLVTKNSFRFLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVRLPDNFKT
 YCAKMSIKTSSIQYENDDIMRESYGDDYGIACCVSAMTIGKQMQUFFGARANLAKT
 LLYAINGGKDEKSGAQVGNPFEGINSEVLEYDEVFKKFDQMMDWLAGVYINSLN
 VIHYMHDKYSYERIEMALHDTEIVRTMATGIAGLSVAADSLSAIKYAQVKPIRNEE
 GLVVDFEIEGDFPKYGNNDDRVDDIAVDLVERFMTKLRSHKTYRDSEHTMSVLT
 TSNVYVGKKTGNTPDGRKAGEPFAPGANPMHGRDQKGALSSLSSVAKIPYDCCK
 DGISNTFSIVPKSLGKEPEDQNRNLTSMLDGYAMQCGHHLNINVFNRRETLIDAME
 HPPEYPQLTIRVSGYAVNFIKLTREQQLDVISRTFHESM

(SEQ ID NO:362)

FIG. 17

MLETNKNHATAWQGFKNRWRNRHVDVREFIQLNYTLYEGNDSFLAGPTEATSK
 LWEQVMQLSKEERERGGMWDMDTKVASTITSHDAGYLDKDLETIVGVQTEKPF
 KRSMQPFGGIRMAKAACEAYGYELDEETEKIFTDYRKTHNQGVFDAYSREMLNC
 RKAGVITGLPDAYGRGRIIGDYRRVALYGVDFLMEEKMHDFNTMSTEMSEDVIR
 LREELSEQYRALKELKELGQKYGFDLRPAENFKEAVQWLYLAYLAAIKEQNGA
 AMSLGRTSTFLDIYAERDLKAGVITSEVQEIIDHFIMKLRIVKFARTPDYNELFSG
 DPTWVTESIGGVGIDGRPLVTKNSFRFLHSLDNLGPAPEPNLTVLWSVRLPDNFKT
 YCAKMSIKTSSIQYENDDIMRESYGDDYGIACCVSAMTIGKQMFFGARANLAKT
 LLYAINGGKDEKSGAQVGNPFEGINSEVLEYDEVFKKFDQMMDWLAGVYINSLN
 VIHYMHDKYSYERIEMALHDTEIVRTMATGIAGLSVAADSLSAIKYAQVKPIRNEE
 GLVVD FEIEGDFPKYGNDDRVDIAVDLVERFMTKLRSHKTYRDSEHTMSVLT
 TSNVVYGGKKTGNTPDGRKAGEPFAPGANPMHGRDQKGALSSSLSSVAKIPYDCCK
 DGISNTFSIVPKSLGKPEDQNRNLTSMLDGYAMQCGHHLNINVFNRRETLIDAME
 HP EEPQLTIRVSGYAVNFIKLTREQQLDVISRTFHESM

(SEQ ID NO:363)

FIG. 18

KKENKQLTYTTVKDIGDMNPHVYGGSMSAESMIYEPLVRNTKDGIKPLLAKKWWG
 VSEDGKTYTFHLRDDVKFHDGTPFDADAVKKNIDAVQENKKLHSWLKISTLIDN
 VKVKDKYTVELNLKEAYQPALAE LAMPRPYVFPKDFKNGTTKDGVKKFDGT
 GPFKLGEHKKDESADFNKNDQYWGEKSKLNKVQAKVMPAGETAFLSMKKGETN
 FAFTDDGGTDSLKSLKQLKDTGDYQVKRSQPMNTKMLVVNSGKKDNAVSDK
 TVRQAIGHMVNRDKIAKEILDGQEKPATQLFAKNVTDINFDMPTRKYDLKKAESL
 LDEAGWKKGKSDVVRQKDGNLEMAMYDYDKGSSSQKEQAEYLQAEFKKMGIK
 LNINGETSDKIAERRTSGDYDLMFNQTWGLLYDPQSTIAAFKAKNGMKVQH QAL
 RIKIKYTTALMTHLKS KTYKSVQTLIKTFNKLMMKVSLSLFHTVVQLLRKIKKY
 HSHNHSTNYHSMKCSIN

(SEQ ID NO:364)

FIG. 19

MRKLTKMSAMLLASGLILTGCGGNKGLEEKKENKQLTYTTVKDIGDMNPHVYGG
 SMSAESMIYEPLVRNTKDGIKPLLAKKWDVSEDGKTYTFHLRDDVKFHDGTPF
 DADAVKKNIDAVQENKKLHSWLKISTLIDNVKVKDKYTVELNLKEAYQPALAE L

11/112

AMPRPYVVFVSPKDFKNGTTKDGVKKFDGTGPFKLGEHKKDESADFNKNDQYWG
EKSKLNKVQAKVMPAGETAFLSMKKGETNFAFTDDRGTDSLKDSLKQLKDTG
DYQVKRSQPMNTKMLVVNSGKKDSAVSDKTVRQAIGHMVNRDKIAKEILDGQE
KPATQLFAKNVTDINFDMPTRKYDLKKAESLLDEAGWKKGKDSVVRQKDGKNL
EMAMYYDKGSSSQKEQAAYLQAEFKKMGIKLNINGETSDKIAERRTSGDYDLMF
NQTWGLLYDPQSTIAAFKAKNGYESATSGIENKDKIYNSIDDAFKIQNGKERSDA
YKNILKQVNDEGIFIPISHGSM TVVAPKDLEKVSFTQSQYELPFNEMQYK
(SEQ ID NO:365)

FIG. 20

MRKLTKMSAMLLASGLILTGC GGNGLEEKKENKQLTYTTVKDIGDMNPHVYG
GMSAESMIYEPLVRNTKDGIKPLLAKKWDVSEDGKTYTFHLRDDVKFHDGTF
DADAVKKNIDAVQQNKKLH SWLKISTLIDNVKVKDKYTVELNLKEAYQPALAEL
AMPRPYVVFVSPKDFKNGTTKDGVKKFDGTGPFKLGEHKKDESADFNKNDQYWG
EKSKLNKVQAKVMPAGETAFLSMKKGETNFAFTDDRGTDSLKDSLKQLKDTG
DYQVKRSQPMNTKMLVVNSGKKDNAVSDKTVRQAIGHMVNRDKIAKEILDGQE
KPATQLFAKNVTDINFDMPTRKYDLKKAESLLDEAGWKKGKDSVVRQKDGKNL
EMAMYYDKGSSSQKEQAAYLQAEFKKMGIKLNINGETSDKIAERRTSGDYDLMF
NQTWGLLYDPQSTIAAFKAKNGYESATSGIENKDKIYNSIDDAFKIQNGKERSDA
YKNILKQIDDEGIFIPISHGSM TVVAPKDLEKVSFTQSQYELPFNEMQYK
(SEQ ID NO:366)

FIG. 21

MRKLTKMSAMLLASGLILTGC GGNGLEEKKENKQLTYTTVKDIGDMNPHVYG
GMSAESMIYEPLVRNTKDGIKPLLAKKWDVSEDGKTYTFHLRDDVKFHDGTF
DADAVKKNIDAVQENKKLH SWLKISTLIDNVKVKDKYTVELNLKEAYQPALAEL
AMPRPYVVFVSPKDFKNGTTKDGVKKFDGTGPFKLGEHKKDESADFNKNDQYWG
EKSKLNKVQAKVMPAGETAFLSMKKGETNFAFTDDRGTDSLKDSLKQLKDTG
DYQVKRSQPMNTKMLVVNSGKKDNAVSDKTVRQAIGHMVNRDKIAKEILDGQE
KPATQLFAKNVTDINFDMPTRKYDLKKAESLLDEAGWKKGKDSVVRQKDGKNL
EMAMYYDKGSSSQKEQAAYLQAEFKKMGIKLNINGETSDKIAERRTSGDYDLMF
NQTWGLLYDPQSTIAAFKAKNGYESATSGIENKDKIYNSIDDAFKIQNGKERSDA
YKNILKQIDDEGIFIPISHGSM TVVAPKDLEKVAFTQSQYELPFNEMQYK
(SEQ ID NO:367)

FIG. 22

MRKLTKMSAMLLASGLILTGC GGNGLEEKKENKQLTYTTVKDIGDMNPHVYG
 GSMSAESMIYEPLVRNTKDGIKPLLAKKWDVSEDGKTYTFHLRDDVKFHDGTPF
 DADAVKKNIDAVQQNKKLH SWLKISTLIDNVKVKDKYTVELNLKEAYQPALAE
 AMPRPYVVFVSPKDFKNGTTKDG VKKFDGTGPFKLGEHKKDESADFNKNDQYWG
 EKSKLNKVQAKVMPAGETAFLSMKKGETNFAFTDDRGTDSLKDSLKQLKDTG
 DYQVKRSQPMNTKMLVVNSGKKDNAVSDKTVRQAIGHMVNRDKIAKEILDGQE
 KPATQLFAKNVTDINFDMPTRKYDLKKAESLLDEAGWKKGKDSVVRQKDGKNL
 EMAMYYDKGSSSQKEQAEYLQAEFKKMGIKLNINGETSDKIAERRTSGDYDLMF
 NQTWGLLYDPQSTIAAFKAKNGYESATSGIENKDKIYNSIDDAFKIQNGKERSGA
 YKNILKQIDDEGIFIPISHGSMTVVAPKDLEKVSFTQSQYELPFNEMQYK
 (SEQ ID NO:368)

FIG. 23

MRKLTKMSAMLLASGLILTGC GGNGLEEKKENKQLTYTTVKDIGDMNPHVYG
 GSMSAESMIYEPLVRNTKDGIKPLLAKKWDVSEDGKTYTFHLRDDVKFHDGTPF
 DADAVKKNIDAVQENKKLH SWLKISTLIDNVKVKDKYTVELNLKEAYQPALAE
 AMPRPYVVFVSPKDFKNGTTKDG VKKFDGTGPFKLGEHKKDESADFNKNDQYWG
 EKSKLNKVQAKVMPAGETAFLSMKKGETNFAFTDDRGTDSLKDSLKQLKDTG
 DYQVKRSQPMNTKMLVVNSGKKDNAVSDKTVRQAIGHMVNRDKIAKEILDGQE
 KPATQLFAKNVTDINFDMPTRKYDLKKAESLLDEAGWKKGKDSVVRQKDGKNL
 EMAMYYDKGSSSQKEQAEYLQAEFKKMGIKLNINGETSDKIAERRTSGDYDLMF
 NQTWGLLYDPQSTIAAFKAKNGYESATSGIENKDKIYNSIDDAFKIQNGKERSDA
 YKNILKQIDDEGIFIPISHGSMTVVAPKDLEKVSFTQSQYELPFNEMQYK
 (SEQ ID NO:369)

FIG. 24

MRKLTKMSAMLLASGLILTGC GGNGLEEKKENKQLTYTTVKDIGDMNPHVYG
 GSMSAESMIYEPLVRNTKDGIKPLLAKKWDVSEDGKTYTFHLRDDVKFHDGTTF
 DADAVKKNIDAVQQNKKLH SWLKISTLIDNVKVKDKYTVELNLKEAYQPALAE
 AMPRPYVVFVSPKDFKNGTTKDG VKKFDGTGPFKLGEHKKDESADFNKNDQYWG
 EKSKLNKVQAKVMPAGETAFLSMKKGETNFAFTDDRGTDSLKDSLKQLKDTG
 DYQVKRSQPMNTKMLVVNSGKKDNAVSDKTVRQAIGHMVNRDKIAKEILDGQE
 KPATQLFAKNVTDINFDMPTRKYDLKKAESLLDEAGWKKGKDSVVRQKDGKNL

EMAMYYDKGSSSQKEQAEYLQAEFKKMGIKLNINGETSDKIAERRTSGDYDLMF
 NQWGLLYDPQSTIAAFKAKNGYESATSGIENKDKIYNSIDDAFKIQNGKERSDA
 YKNILKQIDDEGIFIPISHGSM TVVAPKDLEKVSFTQSQYELPFNEMQYK
 (SEQ ID NO:370)

FIG. 25

MRKLTKMSAMLLASGLILTGCGGNKGLEEKKENKQLTYTTVKDIGDMNPHVYG
 GSMSAESMIYEPLVRNTKDGIKPLLAKKWDVSEDGKTYTFHLRDDVKFHDGTPF
 DADAVKKNIDAVQENKKLHSLWKISTLIDNVKVKDKYTVELNLKEAYQPALAE
 AMPRPYVVFVSPKDFKNGTTKDGVKKFDGTGPFKLGEHKKDESADFNKNDQYWG
 EKSKLNKVQAKVMPAGETAFLSMKKGETNFAFTDDRGTDSLKDSLKQLKDTG
 DYQVKRSQPMNTKMLVVNSGKKDNAVSDKTVRQAIGHMVNRDKIAKEILDGQE
 KPATQLFAKNVTDINFDMPTRKYDLKKAESLLDEAGWKKGKDSVVRQKDGKNL
 EMAMYYDKGSSSQKEQAEYLQAEFKKMGIKLNINGETSDKIAERRTSGDYDLMF
 NQWGLLYDPQSTIAAFKAKNGYESATSGIENKDKIYNSIDDAFKIQNGKERSDA
 YKNILKQIDDEGIFIPISHGSM TVVAPKDLEKVSFTQSQYELPFNEMQYK
 (SEQ ID NO:371)

FIG. 26

MRKLTKMSAMLLTSGLILTGCGGNKGLEEKKENKQLTYTTVKDIGDMNPHVYG
 GSMSAESMIYEPLVRNTKDGIKPLLAKKWDVSEDGKTYTFHLRDDVKFHDGTPF
 DADAVKKNIDAVQENKKLHSLWKISTLIDNVKVKDKYTVELNLKEAYQPALAE
 AMPRPYVVFVSPKDFKNGTTKDGVKKFDGTGPFKLGEHKKDESADFNKNDQYWG
 EKSKLNKVQAKVMPAGETAFLSMKKGETNFAFTDDRGTDSLKDSLKQLKDTG
 DYQVKRSQPMNTKMLVVNSGKKDNAVSDKTVRQAIGHMVNRDKIAKEILDGQE
 KPATQLFAKNVTDINFDMPTRKYDLKKAESLLDEAGWKKGKDSVVRQKDGKNL
 EMAMYYDKGSSSQKEQAEYLQAEFKKMGIKLNINGETSDKIAERRTSGDYDLMF
 NQWGLLYDPQSTIAAFKAKNGYESATSGIENKDKIYNSIDDAFKIQNGKERSDA
 YKNILKQIDDEGIFIPISHGSM TVVAPKDLEKVSFTQSQYELPFNEMQYK
 (SEQ ID NO:372)

FIG. 27

MRKLTKMSAMLLASGLILTGCGGNKGLEEKKENKQLTYTTVKDIGDMNPHVYG
 GSMSAESMIYEPLVRNTKDGIKPLLAKKWDVSEDGKTYTFHLRDDVKFHDGTPF

DADAVKKNIDAVQENKKLHSLWKISTLIDNVKVKDKYTVLNLKEAYQPALAE
 AMPRPYVVFVSPKDFKNGTTKDGVKKFDGTGPFKLGEHKKDESADFNKNDQYWG
 EKSKLNKVQAKVMPAGETAFLSMKKGETNFAFTDDRGTDSLKDSLKQLKDTG
 DYQVKRSQPMNTKMLVVNSGKKDNAVSDKTVRQAIGHMVNRDKIAKEILDGQE
 KPATQLFAKNVTDINFDMPTRKYDLKKAESLLDEAGWKKGKDSVVRQKDGKNL
 EMAMYYDKGSSSQKEQAEYLQAEFKKMGIKLNINGETSDKIAERRTSGDYDLMF
 NQTWGLLYDPQSTIAAFKEKNGYESATSGIENKDKIYNSIDDAFKIQNGKERSDAY
 KNILKQIDDEGIFIPISHGSMTVVAPKDLEKVSFTQSQYELPFNEMQYK
 (SEQ ID NO:373)

FIG. 28

MRKLTKMSAMLLASGLLITGCGGNKGLEEKKENKQLTYTTVKDIGDMNPHVYG
 GSMSAESMIYEPLVRNTKDGKIPLLAKKWDVSEDGKTYTFHLRDDVKFHDGTPF
 DADAVKKNIDAVQQNKKLHSLWKISTLIDNVKVKDKYTVLNLKEAYQPALAE
 AMPRPYVVFVSPKDFKNGTTKDGVKKFDGTGPFKLGEHKKDESADFNKNDQYWG
 EKSKLNKVQAKVMPAGETAFLSMKKGETNFAFTDDRGTDSLKDSLKQLKDTG
 DYQVKRSQPMNTKMLVVNSGKKDNAVSDKTVRQAIGHMVNRDKIAKEILDGQE
 KPATQLFAKNVTDINFDMPTRKYDLKKAESLLDEAGWKKGKDSVVRQKDGKNL
 EMAMYYDKGSSSQKEQAEYLQAEFKKMGIKLNINGETSDKIAERRTSGDYDLMF
 NQTWGLLYDPQSTIAAFKAKNGYESATSGIENKDKIYNSIDDAFKIQNGKERSGA
 YKNILKQIDDEGIFIPISHGSMTVVAPKDLEKVSFTQSQYELPFNEMQYK
 (SEQ ID NO:374)

FIG. 29

SSDSKDKETTSIKHAMGTTEIKGPKRVVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWT
 QKPKFEYIKNDLKDTKIVGQEPAPNLEEISLKPDLIVASKVRNEKVYDQLSKIAPT
 VSTDTVFKFKDTTKLMGKALGKEKEAEDLLKKYDDKVAAFQKDAKAKYKDAW
 PLKASVVNFRADHTRİYAGGYAGEILNDLGFKRNKDLQKQVDNGKDIIQLTSKESI
 PLMNADHIFVVKSDPNAKDAALVKKTESEWTSSKEWKNLDAVKNNQVSDDLDEI
 TWNLAGGYKSSLKLIDDLYEKLNIEKQSK
 (SEQ ID NO:375)

FIG. 30

MNKVIKMLVVTLAFLLVLAGCSGNSNKQSSDNKDKETTSIKHAMGTTEIKGKPK
RVVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQPKPKFEYIKNDLKDTKIVGQEPAPNL
EEISKLKPD LIVASKVRNEKVYDQLSKIAPT VSTDTVFKFKDTTKLMGKALGKEKE
AEDLLKKYDDKVA AFQKDAKAKYKDAWPLKASVVNFRADHTRIYAGGYAGEIL
NDLGFKR NKDLQKQVDNGKDIIQLTSKESIPLMNADHIFVVKSDPNAKDAALVKK
TESEWTSSKEWKNLDAVKNNQVSDDLDEITWNLAGGYKSSLKLIDDLYEKLNIE
KQSK

(SEQ ID NO:376)

FIG. 31

MNKVIKMLVVTLAFLLVLAGCSGNSNKQSSDNKDKETTSIKHAMGTTEIKGKPK
RVVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQPKPKFEYIKNDLKDTKIVGQEPAPNL
EEISKLKPD LIVASKVRNEKVYDQLSKIAPT VSTDTVFKFKDTTKLMGKALGKEKE
AEDLLKKYDDKVA AFQKDAKAKYKDAWPLKASVVNFRADHTRIYAGGYAGEIL
NDLGFKR NKDLQKQVDNGKDIIQLTSKESIPLMNADHIFVVKSDPNAKDAALVKK
TESEWTSSKEWKNLDAVKNNQVSDDLDEITWNLAGGYKSSLKLIDDLYEKLNIE
KQSK

(SEQ ID NO:377)

FIG. 32

MNKVIKMLVVTLAFLLVLAGCSGNSNKQSSDSKDKETTSIKHAMGTTEIKGKPKR
VVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQPKPKFEYIKNDLKDTKIVGQEPAPNLE
EISKLKPD LIVASKVRNEKVYDQLSKIAPT VSTDTVFKFKDTTKLMGKALGKEKE
AEDLLKKYDDKVA AFQKDAKAKYKDAWPLKASVVNFRADHTRIYAGGYAGEIL
NDLGFKR NKDLQKQVDNGKDIIQLTSKESIPLMNADHIFVVKSDPNAKDAALVKK
TESEWTSSKEWKNLDAVKNNQVSDDLDEITWNLAGGYKSSLKLIDDLYEKLNIE
KQSK

(SEQ ID NO:378)

FIG. 33

MNKVIKMLVVTLAFLLVLAGCSGNSNKQSSDNKDKETTSIKHAMGTTEIKGKPK
RVVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQPKPKFEYIKNDLKDTKIVGQEPAPNL
EEISKLKPD LIVASKVRNEKVYDQLSKIAPT VSTDTVFKFKDTTKLMGKALGKEKE

AEDLLKKYDDKVAAFQKDAKAKYKDAWPLKASVVNFRADHTRİYAGGYAGEIL
 ND LGFKRNKDLQKQVDNGKDIIQLTSKESIPLMNADHIFVVKSDPNAKDAALVKK
 TESEWTSSKEWKNLDAVKNNQVSDDLDEITWNLAGGYKSSLKLIDDLYEKLNIE
 KQSK

(SEQ ID NO:379)

FIG. 34

MNKVIKMLVVTLAFLLVLAGCSGNSNKQSSDNKDKETTSIKHAMGTTEIKGKPK
 RVVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQKPKFEYIKNDLKDTKIVGQEPAPNL
 EEISKLKPD LIVASKVRNEKVYDQLSKIAPT VSTDTVFKFKDTTKLMGKALGKEKE
 AEDLLKKYDDKVAAFQKDAKAKYKDAWPLKASVVNFRADHTRİYAGGYAGEIL
 ND LGFKRNKDLQKQVDNGKDIIQLTSKESIPLMNADHIFVVKSDPNAKDAALVKK
 TESEWTSSKEWKNLDAVKNNQVSDDLDEITWNLAGGYKSSLKLIDDLYEKLNIE
 KQSK

(SEQ ID NO:380)

FIG. 35

MNKVIKMLVVTLAFLLVLAGCSGNSNKQSSDNKDKETTSIKHAMGTTEIKGKPK
 RVVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQKPKFEYIKNDLKDTKIVGQEPAPNL
 EEISKLKPD LIVASKVRNEKVYDQLSKIAPT VSTDTVFKFKDTTKLMGKALGKEKE
 AEDLLKKYDDKVAAFQKDAKAKYKDAWPLKASVVNFRADHTRİYAGGYAGEIL
 ND LGFKRNKDLQKQVDNGKDIIQLTSKESIPLMNADHIFVVKSDPNAKDAALVKK
 TESEWTSSKEWKNLDAVKNNQVSDDLDEITWNLAGGYKSSLKLIDDLYEKLNIE
 KQSK

(SEQ ID NO:381)

FIG. 36

MNKVIKMLVVTLAFLLVLAGCSGNSNKQSSDNKDKETTSIKHAMGTTEIKGKPK
 RVVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQKPKFEYIKNDLKDTKIVGQEPAPNL
 EEISKLKPD LIVASKVRNEKVYDQLSKIAPT VSTDTVFKFKDTTKLMGKALGKEKE
 AEDLLKKYDDKVAAFQKDAKAKYKDAWPLKASVVNFRADHTRİYAGGYAGEIL
 ND LGFKRNKDLQKQVDNGKDIIQLTSKESIPLMNADHIFVVKSDPNAKDAALVKK
 TESEWTSSKEWKNLDAVKNNQVSDDLDEITWNLAGGYKSSLKLIDDLYEKLNIE
 KQSK (SEQ ID NO:382)

FIG. 37

MNKVIKMLVVTLAFLLVLAGCSGNSNKQSSDNKDKETTSIKHAMGTTEIKGKPK
RVVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQPKPKFEYIKNDLKDTKIVGQEPAPNL
EEISKLKPDIVASKVRNEKVYDQLSKIAPT VSTDTVFKFKDTTKLMGKALGKEKE
AEDLLKKYDDKVA AFQKDAKAKYKDAWPLKASVVNFRADHTR IYAGGYAGEIL
NDLGFKR NKDLQKQVDNGKDIIQLTSKESIPLMNADHIFVVKSDPNAKDAALVKK
TESEWTSSKEWKNLDAVKNNQVSDDLDEITWNLAGGYKSSLKLIDDLYEKLNIE
KQSK

(SEQ ID NO:383)

FIG. 38

MNKVIKMLVVTLAFLLVLAGCSGNSNKQSSDNKDKETTSIKHAMGTTEIKGKPK
RVVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQPKPKFEYIKNDLKDTKIVGQEPAPNL
EEISKLKPDIVASKVRNEKVYDQLSKIAPT VSTDTVFKFKDTTKLMGKALGKEKE
AEDLLKKYDDKVA AFQKDAKAKYKDAWPLKASVVNFRADHTR IYAGGYAGEIL
NDLGFKR NKDLQKQVDNGKDIIQLTSKESIPLMNADHIFVVKSDPNAKDAALVKK
TESEWTSSKEWKNLDAVKNNQVSDDLDEITWNLAGGYKSSLKLIDDLYEKLNIE
KQSK

(SEQ ID NO:384)

FIG. 39

MNKVIKMLVVTLAFLLVLAGCSGNSNKQSSDNKDKETTSIKHAMGTTEIKGKPK
RVVTLYQGATDVAVSLGVKPVGAVESWTQPKPKFEYIKNDLKDTKIVGQEPAPNL
EEISKLKPDIVASKVRNEKVYDQLSKIAPT VSTDTVFKFKDTTKLMGKALGKEKE
AEDLLKKYDDKVA AFQKDAKAKYKDAWPLKASVVNFRADHTR IYAGGYAGEIL
NDLGFKR NKDLQKQVDNGKDIIQLTSKESIPLMNADHIFVVKSDPNAKDAALVKK
TESEWTSSKEWKNLDAVKNNQVSDDLDEITWNLAGGYKSSLKLIDDLYEKLNIE
KQSK

(SEQ ID NO:385)

FIG. 40

KESSTKDTISVKDENGTVKVPKDAKRIVVLEYSFADALAALDVKPVGIADDGKKK
RIIKPVREKIGDYTSVGRKQPNLEEISKLKPDIIADSSRHKGINKELNKIAP TSLK
SFDGDYKQNINSFKTIKALNKEKEGKRLAEHDKLIKKYKDEIKFDRNQKVLPA

VVAKAGLLAHPNYSYVGQFLNELGFKNALSDDVTKGLSKYLKGPYLQLDTEHLA
DLNPERMIIMTDNAKKDSAEFKKLQEDPTWKKLNAVKNRVDIVDRDVWARSR
GLISSEEMAKELVELSKKEQK
(SEQ ID NO:386)

FIG. 41

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPTVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
(SEQ ID NO:387)

FIG. 42

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPTVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
(SEQ ID NO:388)

FIG. 43

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDIEKVAKEKPDII
YSTDKDIKKYQKVAPTVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
TTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQPE
QQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
(SEQ ID NO:389)

FIG. 44

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDCKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK

(SEQ ID NO:390)

FIG. 45

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDCKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK

(SEQ ID NO:391)

FIG. 46

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDCKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK

(SEQ ID NO:392)

FIG. 47

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDCKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK

(SEQ ID NO:393)

FIG. 48

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
 PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
 VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
 ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDCKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
 EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
 HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK

(SEQ ID NO:394)

FIG. 49

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
 PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
 VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
 ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDCKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
 EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
 HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK

(SEQ ID NO:395)

FIG. 50

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
 PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
 VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
 ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDCKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
 EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
 HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK

(SEQ ID NO:396)

FIG. 51

TEEKTEMTTIKDELGTEKIKKNPKRVVVLEYSFADYLAALDMKPVGIADDGSSKN
 ITKSVRDKIGAYESVGSRSQPNMEVISKLPDLIADVSRHKKIKSELSKIAPTIMLV
 SGTGDYNANIEAFKTVAKAVGREKEGEKRLKHKILAEIRKKIEQSTLKSALG
 ISRAGMFINNEDTFMGQFLIKMGIQPEVTKDKTAHVGERKGGPYIYLNNEELANIN
 PKVMILATDGKTDKNRTKFIDPAVWKS LKAVKDNKVYDVDRNKWLKSRGIIASE
 SMAEDLEKIAEKAK

(SEQ ID NO:397)

FIG. 52

MEVSKLKPDLIADVNRHKKIKSELSKIAPTIMLVSGTGDYNANIEAFKTVAKAV
 GKEKEGKRLKHKILAEIRKKIEQSTLKSFAFGISRAGMFINNEDTFMGQFLIK
 MGIQPEVTKDKTMHVGERKGGPYTYLNNEELANINPKVMILATDGKTDKNRTKFI
 DPAVWKS LKAVKDNKVYDVDRNKWLKSRGIASESMAEDLEKIAEKAK
 (SEQ ID NO:398)

FIG. 53

MNRNIVKLVVFM LILVVAVAGCGQKDTEEKTEM TTIKDELGTEKIKKNPKRVVV
 LEYSFADYLAALDMKPVGIADDGSTKNITKSVRDKIGAYESVGSRPQPNMEVISK
 LKPDIIADVSRHKKIKSELSKIAPTIMLVSGTGDYNANIEAFKTVAKAVGKEKEG
 EKRLEKHKILAEIRKKIEQSTLKSFAFGISRAGMFINNEDTFMGQFLIKMGIQPE
 VTKDKTTHVGERKGGPYTYLNNEELANINPKVMILATDGKTDKNRTKFI DPAVW
 KSLKAVKDNKVYDVDRNKWLKSRGIASESMAEDLEKIAEKAK
 (SEQ ID NO:399)

FIG. 54

MNRNIVKLVVFM LILVVAVAGCGQKDTEEKTEM TTIKDELGTEKIKKNPKRIVVL
 EYSFADYLAALDMKPVGIADDGSTKNITKSVRDKIGAYESVGSRPQPNMEVISKL
 KPDIIADVSRHKKIKSELSKIAPTIMLVSGTGDYNANIEAFKTVAKAVGKEKEGE
 KRLEKHNLAEIRKKIEQSTLKSFAFGISRAGMFINNEDTFMGQFLIKMGIQPEV
 TKDKTAHVGERKGGPYTYLNNEELANINPKVMILATNGKTDKNRTKFI DPAVWKS
 LKAVKDNKVYDVDRNKWLQSRGIMASESMAEDLEKIAEKAK
 (SEQ ID NO:400)

FIG. 55

MNRNIVKLVVFM LILVVAVAGCGQKDTEEKTEM TTIKDELGTEKIKKNPKRVVV
 LEYSFADYLAALDMKPVGIADDGSSKNITKSVRDKIGAYESVGSRPQPNMEVISKL
 KPDIIADVSRHKKIKSELSKIAPTIMLVSGTGDYNANIEAFKTVAKAVGKEKEGE
 KRLEKHKILAEIRKKIEQSTLKSFAFGISRAGMFINNEDTFMGQFLLKMGIQPEV
 TKDKTTHVGERKGGPYTYLNNEELANINPKVMILATDGKTDKNRTKFI DPAVWKS
 LKAVKDNKVYDVDRNKWLKSRGIASESMAEDLEKIAEKAK
 (SEQ ID NO:401)

FIG. 60

MTTIKDELGTEKIKKNPKRVVVLEYSFADYLAALDMKPVGIADDGSTKNITKSVR
 DKIGAYESVGSRPQPNMEVISKLPDLIADVSRHKKIKSELSKIAPTIMLVSGTGD
 YNANIEAFKTVAKAVGKEKEGEBKRLEKHDKILAEIRKKIEQSTLKSFAFGISRAG
 MFINNEDTFMGQFLIKMGIQPEVTKDKTTHVGERKGGPYTYLNNEELANINPKVMI
 LATDGKTDKNRTKFIDPAVWKS LKAVKDNKVYDVDRNKWLKSRGIIASESMAED
 LEKIAEKAK

(SEQ ID NO:406)

FIG. 61

MNRNIVKLVVFMILLVAVAGCGQKDTEEKTEMTTIKDELGTEKIKKNPKRVVV
 LEYSFADYLAALDMKPVGIADDGSSKNITKSVRDKIGAYESVGSRPQPNMEVISKL
 KPDLIADVSRHKKIKSELSKIAPTIMLVSGTGDYNANIEAFKTVAKAVGKEKEGE
 KRLEKHDKILAEIRKKIEQSTLKSFAFGISRAGMFINNEDTFMGQFLKMGIQPEV
 TKDKTTHVGERKGGPYTYLNNEELANINPKVMILATDGKTDKNRTKFIDPAVWKS
 LKAVKDNKVYDVDRNKWLKSRGIIASESMAEDLEKIAEKAK

(SEQ ID NO:407)

FIG. 62

GSDDNGSSKSPYHRIVSLMPSNTEILYELGLGKYIVGVSTVDDYPKDVKKGKKQF
 DALNLNKEELLKAKPDLILAHESQKATANKVLSSLEKQGIKVVYVKDAQSIDETY
 NTFKQIGKLTTHDKQAEQLVEETKDNIDKVIDSIPAHHKKSKVFIEVSSKPEIYTAG
 KHTFFNDMLEKLEAQNVSNDINGWNPVTKESIHKKNPDILISTEAKTRSDYMDIHK
 RGGFNKINAVKNTRIEVVNGDEVSRPGPRIDEGLKELRDAIYRK

(SEQ ID NO:408)

FIG. 63

MKKSIIAFILIFMLVLSGCGMKDNDKQGSDDNGSSKSPYHRIVSLMPSNTEILYEL
 GLGKYIVGVSTVDDYPKDVKKGKKQFDALNLNKEELLKAKPDLILAHESQKATA
 NKVLSSLEKQGIKVVYIKDAQSIDETYNTFKQIGKLTTHDKQAEQLVEETKDNIDK
 VIDSIPAHHKKSKVFIEVSSKPEIYTAGKHTFFNDMLEKLEAQNVSNDINGWNPVT
 KESIHKKNPDILISTEAKTRSDYMDIHKRGGFNKINAVKNTRIEVVNGDEVSRPGP
 RIDEGLKELRDAIYRK

(SEQ ID NO:409)

FIG. 64

MKKS~~LI~~A~~FIL~~I~~FML~~V~~LS~~G~~CG~~M~~KD~~N~~DK~~Q~~G~~S~~DD~~N~~G~~S~~S~~K~~S~~P~~Y~~H~~R~~I~~V~~S~~L~~M~~P~~S~~N~~T~~E~~I~~L~~Y~~E~~L
GLGKYIVGVSTVDDYPKDVKEGKKQFDALN~~LN~~KEELLKAKPDLILAHESQKATA
NKVLS~~S~~LEKQGIKVVYVKDAQSIDETYNTFKQIGKLT~~HH~~DKQAEQLVEETKDNID
KVIDSIPAH~~HK~~K~~S~~KV~~F~~I~~E~~V~~S~~S~~K~~P~~E~~I~~Y~~T~~A~~G~~K~~H~~T~~F~~F~~N~~D~~M~~L~~E~~K~~L~~E~~A~~Q~~N~~V~~Y~~S~~D~~I~~N~~G~~W~~N~~P~~V~~
TKESI~~IK~~K~~N~~P~~D~~I~~L~~I~~S~~T~~E~~A~~K~~T~~R~~S~~D~~Y~~M~~D~~I~~I~~K~~K~~R~~G~~G~~F~~N~~K~~I~~N~~A~~V~~K~~N~~T~~R~~I~~E~~V~~V~~N~~G~~D~~E~~V~~S~~R~~P~~G~~P
RIDEGLKELRDAIYRK

(SEQ ID NO:410)

FIG. 65

MKKS~~LI~~A~~FIL~~I~~FML~~V~~LS~~G~~CG~~M~~KD~~N~~DK~~Q~~G~~S~~DD~~N~~G~~S~~S~~K~~S~~P~~Y~~H~~R~~I~~V~~S~~L~~M~~P~~S~~N~~T~~E~~I~~L~~Y~~E~~L
GLGKYIVGVSTVDDYPKDV~~K~~G~~K~~G~~K~~QFDALN~~LN~~KEELLKAKPDLILAHESQKATA
NKVLS~~S~~LEKQGIKVVYVKDAQSIDETYNTFKQIGKLT~~H~~HEKQAEQLVEETKDNID
KVIDSIPAH~~HK~~K~~S~~KV~~F~~I~~E~~V~~S~~S~~K~~P~~E~~I~~Y~~T~~A~~G~~K~~H~~T~~F~~F~~N~~D~~M~~L~~E~~K~~L~~E~~A~~Q~~N~~V~~Y~~S~~D~~I~~N~~G~~W~~N~~P~~V~~
TKESI~~IK~~K~~N~~P~~D~~I~~L~~I~~S~~T~~E~~A~~K~~T~~R~~S~~D~~Y~~M~~D~~I~~I~~K~~K~~R~~G~~G~~F~~N~~K~~I~~N~~A~~V~~K~~N~~T~~R~~I~~E~~V~~V~~N~~G~~D~~E~~V~~S~~R~~P~~G~~P
RIDEGLKELRDAIYRK

(SEQ ID NO:411)

FIG. 66

MKKS~~LI~~A~~FIL~~I~~FML~~V~~LS~~G~~CG~~M~~KD~~N~~DK~~Q~~G~~S~~ND~~N~~G~~S~~S~~K~~S~~P~~Y~~H~~R~~I~~V~~S~~L~~M~~P~~S~~N~~T~~E~~I~~L~~Y~~E~~L
GLGKYIVGVSTVDDYPKDVKEGKKQFDALN~~LN~~KEELL~~K~~E~~K~~PDLILAHESQKATA
NKVLS~~S~~LEKQGIKVVYVKDAQSIDETYNTFKQIGKLT~~HH~~DKQAEQLVEETKDNID
KVIDSIPAH~~HK~~K~~S~~KV~~F~~I~~E~~V~~S~~S~~K~~P~~E~~I~~Y~~T~~A~~G~~K~~H~~T~~F~~F~~N~~D~~M~~L~~E~~K~~L~~E~~A~~Q~~N~~V~~Y~~S~~D~~I~~N~~G~~W~~N~~P~~V~~
TKESI~~IK~~K~~N~~P~~D~~I~~L~~I~~S~~T~~E~~A~~K~~T~~R~~S~~D~~Y~~M~~D~~I~~I~~K~~K~~R~~G~~G~~F~~N~~K~~I~~N~~A~~V~~K~~N~~T~~R~~I~~E~~V~~V~~N~~G~~D~~E~~V~~S~~R~~P~~G~~P
RIDEGLKELRDAIYRK

(SEQ ID NO:412)

FIG. 67

MKKS~~LI~~A~~FIL~~I~~FML~~V~~LS~~G~~CG~~M~~KD~~N~~DK~~Q~~G~~S~~ND~~N~~G~~S~~S~~K~~S~~P~~Y~~H~~R~~I~~V~~S~~L~~M~~P~~S~~N~~T~~E~~I~~L~~Y~~E~~L
GLGKYIVGVSTVDDYPKDV~~K~~G~~K~~G~~K~~QFDALN~~LN~~KEELLKAKPDLILAHESQKATA
NKVLS~~S~~LEKQGIKVVYVKDAQSIDETYNTFKQIGKLT~~HH~~DKQAEQLVEETKDNID
KVIDSIPAH~~HK~~K~~S~~KV~~F~~I~~E~~V~~S~~S~~K~~P~~E~~I~~Y~~T~~A~~G~~K~~H~~T~~F~~F~~N~~D~~M~~L~~E~~K~~L~~E~~A~~Q~~N~~V~~Y~~S~~D~~I~~N~~G~~W~~N~~P~~V~~
TKESI~~IK~~K~~N~~P~~D~~I~~L~~I~~S~~T~~E~~A~~K~~T~~R~~S~~D~~Y~~M~~D~~I~~I~~K~~K~~R~~G~~G~~F~~N~~K~~I~~N~~A~~V~~K~~N~~T~~R~~I~~E~~V~~V~~N~~G~~D~~E~~V~~S~~R~~P~~G~~P
RIDEGLKELRDAIYRK

(SEQ ID NO:413)

FIG. 68

MKKSLLAFILIFMLVLSGCGMKDNDKQGSDDNGSSKSPYHRIVSLMPSNTEILYEL
GLGKYIVGVSTVDDYPKDVKEGKKQFDALNLNKEELLKAKPDLILAHESQKATA
NKVLSSLEKQGIKVVYVKDAQSIDETYNTFKQIGKLTHHDKQAEQLVEETKDNID
KVIDSIPAHHKSSKVFIEVSSKPEIYTAGKHTFFNDMLEKLEAQNVSINGWNPV
TKESIHKKNPDILISTEAKTRSDYMDIHKRGGFNKINAVKNTRIEVVNGDEVSRPGP
RIDEGLKELRDAIYRK
(SEQ ID NO:414)

FIG. 69

MKDNDKQGSNDNGSSKSPYHRIVSLMPSNTEILYELGLGKYIVGVSTVDDYPKDV
KKGKKQFDALNLNKEELLKAKPDLILAHESQKATANKVLSSLEKQGIKVVYVKD
AQSIDETYNTFKQIGKLTHHDKQAEQLVEETKDNIDKVIDSIPAHHKSSKVFIEVSS
KPEIYTAGKHTFFNDMLEKLEAQNVSINGWNPVTKESIHKKNPDILISTEAKTRS
DYMDIHKRGGFNKINAVKNTRIEVVNGDEVSRPGPRIDEGLKELRDAIYRK
(SEQ ID NO:415)

FIG. 70

MKKSLLAFILIFMLVLSGCGMKDNDKQGSNDNGSSKSPYHRIVSLMPSNTEILYEL
GLGKYIVGVSTVDDYPKDVKKGKKQFDALNLNKEELLKAKPDLILAHESQKATA
NKVLSSLEKQGIKVVYVKDAQSIDETYNTFKQIGKLTHHDKQAEQLVEETKDNID
KVIDSIPAHHKSSKVFIEVSSKPEIYTAGKHTFFNDMLEKLEAQNVSINGWNPV
TKESIHKKNPDILISTEAKTRSDYMDIHKRGGFNKINAVKNTRIEVVNGDEVSRPGP
RIDEGLKELRDAIYRK
(SEQ ID NO:416)

FIG. 71

MKDNDKQGSNDNGSSKSPYHRIVSLMPSNTEILYELGLGKYIVGVSTVDDYPKDV
KKGKKQFDALNLNKEELLKAKPDLILAHESQKATANKVLSSLEKQGIKVVYVKD
AQSIDETYNTFKQIGKLTHHDKQAEQLVEETKDNIDKVIDSIPAHHKSSKVFIEVSS
KPEIYTAGKHTFFNDMLEKLEAQNVSINGWNPVTKESIHKKNPDILISTEAKTRS
DYMDIHKRGGFNKINAVKNTRIEVVNGDEVSRPGPRIDEGLKELRDAIYRK
(SEQ ID NO:417)

FIG. 72

MKKSLLAFILIFMLVLSGCGMKDNDKQGSNDNGSSKSPYHRIVSLMPSNTEILYEL
GLGKYIVGVSTVDDYPKDVKEGKKQFDALNLNKEELLKEKPDILILAHESQKATA
NKVLSSELEKQGIKVVYVKDAQSIDETYNTFKQIGKLTTHDKQAEQLVEETKDNID
KVIDSIPAHKKSKVFIKVSSKPEIYTAGKHTFFNDMLEKLEAQNVSVDINGWNPV
TKESIKKNPDILISTEAKTRSDYMDIHKRGGFNKINAVKNTRIEVVNGDEVSRPGP
R IDEGLKELRDAIYRK

(SEQ ID NO:418)

FIG. 73

SDKSNGKLLKVVTTNSILYDMAKNVGGDNVDIHSIVPVGQDPHEYEYVVKPKDIKLLT
DADVILYNGLNLETGNGWFEKALEQAGKSLKDKKVIKAVSKDVKPIYLNGEEGNK
DKQDPHAWLSLDNGIKYVKTIQQTFFIDNDKKHKADYEKQGNKYIAQLEKLNNDK
KDKFNDIPKEQRAMITSEGAFKYFSKQYGITPGYIWEINTEKQGTPEQMRQAIEFV
KKHKLKHLVETSVDKAMESLSEETKKDIFGEVYTD SIGKEGTKGDSYKMMK
SNIETVHGSMK

(SEQ ID NO:419)

FIG. 74

MKKLVP LLLALLLVAACGTGGKQSSDKSNGKLLKVVTTNSILYDMAKNVGGDN
VDIHSIVPVGQDPHEYEYVVKPKDIKLLTDADVILYNGLNLETGNGWFEKALEQAGK
SLKDKKVIKAVSKDVKPIYLNGEEGNKDKQDPHAWLSLDNGIKYVKTIQQTFFIDND
KKHKADYEKQGNKYIAQLEKLNNDKDKFNDIPKEQRAMITSEGAFKYFSKQYGI
TPGYIWEINTEKQGTPEQMRQAIEFVKKHKLKHLVETSVDKAMESLSEETKKD
IFGEVYTD SIGKEGTKGDSYKMMKSNIETVHGSMK

(SEQ ID NO:420)

FIG. 75

MKKLVP LLLALLLVAACGTGGKQSSDKSNGKLLKVVTTNSILYDMAKNVGGDN
VDIHSIVPVGQDPHEYEYVVKPKDIKLLTDADVILYNGLNLETGNGWFEKALEQAGK
SLKDKKVIKAVSKDVKPIYLNGEEGNKDKQDPHAWLSLDNGIKYVKTIQQTFFIDND
KKHKADYEKQGNKYIAQLEKLNNDKDKFNDIPKEQRAMITSEGAFKYFSKQYGI
TPGYIWEINTEKQGTPEQMRQAIEFVKKHKLKHLVETSVDKAMESLSEETKKD
IFGEVYTD SIGKEGTKGDSYKMMKSNIETVHGSMK

(SEQ ID NO:421)

FIG. 76

MKKLVPLLLALLLLVAACGTGGKQSSDKSNGKLVVTTNSILYDMAKNVGGDN
VDIHSIVPVGQDPHEYEVPKPKDIKCLTDADVILYNGLNLETGNGWFEKALEQAGK
SLKDKKVIADVSKDVKPIYLNGBEGNKDKQDPHAWLSLDNGIKYVKTIQQTFFIDND
KKHKADYEKQGNKYIAQLEKLNNSDKDKFNDIPKEQRAMITSEGAFKYFSKQYGI
TPGYIWEINTEKQGTPEQMRQAIEFVKKHKLKHLVETSVDKKAMESLSEETKKD
IFGEVYTD SIGKEGTKGDSYYKMMKSNIETVHGSMK

(SEQ ID NO:422)

FIG. 77

MKKLVPLLLALLLLVAACGTGGKQSSDKSNGKLVVTTNSILYDMAKNVGGDN
VDIHSIVPVGQDPHEYEVPKPKDIKCLTDADVILYNGLNLETGNGWFEKALEQAGK
SLKDKKVIADVSKDVKPIYLNGBEGNKDKQDPHAWLSLDNGIKYVKTIQQTFFIDND
KKHKADYEKQGNKYIAQLEKLNNSDKDKFNDIPKEQRAMITSEGAFKYFSKQYGI
TPGYIWEINTEKQGTPEQMRQAIEFVKKHKLKHLVETSVDKKAMESLSEETKKD
IFGEVYTD SIGKEGTKGDSYYKMMKSNIETVHGSMK

(SEQ ID NO:423)

FIG. 78

MKKLVPLLLALLLLVAACGTGGKQSSDKSNGKLVVTTNSILYDMAKNVGGDN
VDIHSIVPVGQDPHEYEVPKPKDIKCLTDADVILYNGLNLETGNGWFEKALEQAGK
SLKDKKVIADVSKDVKPIYLNGBEGNKDKQDPHAWLSLDNGIKYVKTIQQTFFIDND
KKHKADYEKQGNKYIAQLEKLNNSDKDKFNDIPKEQRAMITSEGAFKYFSKQYGI
TPGYIWEINTEKQGTPEQMRQAIEFVKKHKLKHLVETSVDKKAMESLSEETKKD
IFGEVYTD SIGKEGTKGDSYYKMMKSNIETVHGSMK

(SEQ ID NO:424)

FIG. 79

MKKLVPLLLALLLLVAACGTGGKQSSDKSNGKLVVTTNSILYDMAKNVGGDN
VDIHSIVPVGQDPHEYEVPKPKDIKCLTDADVILYNGLNLETGNGWFEKALEQAGK
SLKDKKVIADVSKDVKPIYLNGBEGNKDKQDPHAWLSLDNGIKYVKTIQQTFFIDND
KKHKADYEKQGNKYIAQLEKLNNSDKDKFNDIPKEQRAMITSEGAFKYFSKQYGI
TPGYIWEINTEKQGTPEQMRQAIEFVKKHKLKHLVETSVDKKAMESLSEETKKD
IFGEVYTD SIGKEGTKGDSYYKMMKSNIETVHGSMK

(SEQ ID NO:425)

图 80

本图展示了在特定条件下，系统内部各要素之间的相互作用。图中包含多个节点和连接，反映了系统的复杂性和动态性。这些要素可能代表不同的子系统或组件，它们通过相互协作实现整体功能。

图 80 说明

图 81

本图展示了在特定条件下，系统内部各要素之间的相互作用。图中包含多个节点和连接，反映了系统的复杂性和动态性。这些要素可能代表不同的子系统或组件，它们通过相互协作实现整体功能。

图 81 说明

图 82

本图展示了在特定条件下，系统内部各要素之间的相互作用。图中包含多个节点和连接，反映了系统的复杂性和动态性。这些要素可能代表不同的子系统或组件，它们通过相互协作实现整体功能。

图 82 说明

图 83

本图展示了在特定条件下，系统内部各要素之间的相互作用。图中包含多个节点和连接，反映了系统的复杂性和动态性。这些要素可能代表不同的子系统或组件，它们通过相互协作实现整体功能。

图 83 说明

FIG. 84

TTAGAAACAAATAAAAATCATGCAACAGCTTGGCAAGGATTTAAAAATGGAA
GATGGAACAGACACGTAGATGTAAGAGAGTTTATCCAATTAAACTACACTCTT
TATGAAGGTAATGATTCATTTTTAGCAGGACCAACAGAAGCAACTTCTAAACT
TTGGGAACAAGTAATGCAGTTATCGAAAGAAGAACGTGAACGTGGCGGCATG
TGGGATATGGACACGAAAGTAGCTTCAACAATCACATCTCATGATGCTGGTTA
TTTAGACAAAGATTTAGAAACAATTGTAGGTGTACAAACTGAAAAGCCATTCA
AACGTTCAATGCAACCATTTCGGTGGTATTCGTATGGCGAAAGCAGCTTGTGAA
GCTTACGGTTACGAATTAGACGAAGAACTGAAAAAATCTTTACAGATTATCG
TAAACACATAACCAAGGTGTATTCGATGCATATTCTAGAGAAATGTTGAACT
GCCGTAAAGCAGGTGTAATCACTGGTTTTACCTGATGCATACGGACGTGGACGT
ATTATCGGTGACTATCGTCGIGTAGCTTTATATGGTGTAGATTTCTTAATGGAA
GAAAAAATGCACGACTTCAACACGATGTCTACAGAAATGTCAGAAGATGTAA
TTCGTTTACGTGAAGAATTATCAGAACAATATCGTGCATTAAGAATTA
GAACTTGGGCAAAAATATGGTTTTCGATTTAAGCCGTCCAGCAGAAACTTCAA
AGAAGCAGTTCAATGGTTATACTTAGCATACCTTGCTGCAATTAAGAACAAA
ACGGTGCAGCAATGAGTTTAGGTTCGTACATCAACATACTTAGATATCTATGCT
GAACGTGACCTTAAAGCAGGTGTTATTACTGAAAGCGAAGTTCAAGAAATTAT
TGACCACTTCATCATGAAATTACGTATTGTTAAATTTGCTCGTACACCTGATTA
CAATGAATTATTCTCTGGAGACCCAACCTTGGGTAACCTGTATCTATCGGTGGT
TAGGTATTGACGGACGTCCACTTGTTACGAAAACTCATTCCGTTTCTTACACT
CATTAGATAACTTAGGTCCAGCACCAGAACCAAACTTAACAGTATTATGGTCA
GTACGTTTACCTGACAACCTTCAAACATACTGTGCAAAAATGAGTATTA
AACAGTTCTATCCAATATGAAAATGATGACATTATGCGTGAAAGCTATGGCGATG
ACTATGGTATCGCATGTTGTGTATCAGCGGTGACAATTGGTAAACAAATGCAA
TTCTTCGGTGCACGTGCGAACATAGCTAAAACATTACTTTACGCTATCAATGG
TGGTAAAGATGAAAAGTCTGGTGCACAAGTTGGTCCAAACTTCGAAGGTATTA
ACAGCGAAGTATTAGAATATGACGAAGTATTCAAGAAATTTGATCAAATGAT
GGATTGGCTAGCAGGTGTTACATTAACCTCATTAAATGTTATTCACTACATGCA
CGATAAATACAGCTATGAACGTATTGAAATGGCATTACATGATACAGAAATTG
TACGTACAATGGCAACAGGTATCGCTGGTTTATCAGTAGCAGCTGACTCATT
TCTGCAATTAATATGCACAAGTTAAACCAATTCGTAACGAAGAAGGTCTTGT
AGTAGACTTTGAAATCGAAGGCGACTTCCCTAAATACGGTAACAATGACGACC
GTGTAGATGATATCGCAGTTGATTTAGTAGAACGCTTTATGACTAAATTACGT

AGTCATAAAACATATCGTGATTCAGAACATACAATGAGTGTATTAACAATTAC
TTCAAACGTTGTATACGTTAAGAAAACCTGGTAACACACCAGACGGACGTA
GCTGGCGAACCATTTGCACCAGGTGCAAACCAATGCATGGCCGTGACCAAA
AAGGTGCATTATCTTCATTAAGTTCTGTAGCTAAGATCCCTTACGATTGCTGTA
AAGATGGTATTTCAAATACATTCAGTATCGTACCAAAATCATTAGGTAAAGAA
CCAGAAGATCAAACCGTAACTTAACTAGTATGTTAGATGGTTACGCAATGCA
ATGTGGTCAACCTTAAATATTAACGTATTTAACCGTGAAACATTAATAGATG
CAATGGAACATCCAGAAGAATATCCACAGTTAACAATCCGTGTATCTGGTTAC
GCTGTAACTTCATTAATTAACACGTGAACAACAGTTAGATGTAATTTCTCGT
ACATTCCATGAAAGTATGTAA

(SEQ ID NO:430)

FIG. 85

ATGTTAGAAACAAATAAAAATCATGCAACAGCTTGGCAAGGATTTAAAAATG
GAAGATGGAACAGACACGTAGATGTAAGAGAGTTTATCCAATTAACCTACAC
TCTTTATGAAGGTAATGATTCATTTTTAGCAGGACCAACAGAAGCAACTTCTA
AACTTTGGGAACAAGTAATGCAGTTATCGAAAGAAGAACGTGAACGTGGCGG
CATGTGGGATATGGACACGAAAGTAGCTTCAACAATCACATCTCATGATGCTG
GTTATTTAGACAAAGATTTAGAAACAATTGTAGGGGTACAAACTGAAAAGCCA
TTCAAACGTTCAATGCAACCATTCGGTGGTATTCGTATGGCGAAAGCAGCTTG
TGAAGCTTACGGTTACGAATTAGACGAAGAACTGAAAAAATCTTTACAGATT
ATCGTAAAACACATAACCAAGGTGTATTCGATGCATATTCTAGAGAAATGTTG
AACTGCCGTAAAGCAGGTGTAATCACTGGTTTACCTGATGCATACGGACGTGG
ACGTATTATCGGTGACTATCGTCGTGTAGCTTTATATGGTGTAGATTTCTTAAT
GGAAGAAAAAATGCACGACTTCAACACGATGTCTACAGAAATGTCAGAAGAT
GTAATTCGTTTACGTGAAGAATTATCAGAACAATATCGTGCATTAAGAATT
AAAAGAACTTGGACAAAAATATGGTTTCGATTTAAGCCGTCCAGCAGAAAAC
TTCAAAGAAGCAGTTCAATGGTTATACTTAGCATACCTTGCTGCAATTAAGA
ACAAAACGGTGCAGCAATGAGTTTAGGTCGTACATCAACATTCTTAGATATCT
ATGCTGAACGTGACCTTAAAGCAGGTGTTATTAAGCGAAGTCAAGAA
ATTATTGACCACTTCATCATGAAATTACGTATTGTTAAATTTGCTCGTACACCT
GATTACAATGAATTATTCTCTGGAGACCAACTTGGGTAACCTGAATCTATCGG
TGGTGTAGGTATTGACGGACGTCCACTTGTTACGAAAAACTCATTCCGTTTCTT
ACACTCATTAGATAACTTAGGTCCAGCACCAGAACCAAACTTAAACAGTATTAT

GGTCAGTACGTTTACCTGACAACCTTCAAACATACTGTGCAAAAATGAGTATT
AAAACAAGTTCTATCCAATATGAAAATGATGACATTATGCGTGAAAGCTATGG
CGATGACTATGGTATCGCATGTTGTGTATCAGCGATGACAATTGGTAAACAAA
TGCAATTCTTCGGTGCACGTGCGAACTTAGCTAAAACATTACTTTACGCTATCA
ATGGTGGTAAAGATGAAAATCTGGCGCACAAAGTTGGTCCAAACTTCGAAGG
TATTAACAGCGAAGTATTAGAATATGACGAAGTATTCAAGAAATTTGATCAAA
TGATGGATTGGCTAGCAGGTGTTTACATTAACTCATTAAATGTTATTCACTACA
TGCACGATAAATACAGCTATGAACGTATTGAAATGGCATTACATGATACAGAA
ATTGTACGTACAATGGCAACAGGTATCGCTGGTTTATCAGTAGCAGCTGACTC
ATTATCTGCAATTAATATGCACAAGTTAAACCAATTCGTAACGAAGAAGGTC
TTGTAGTAGACTTTGAAATCGAAGGCGACTTCCCTAAATACGGTAACAATGAC
GACCGTGTAGATGATATCGCAGTTGATTTAGTAGAACGCTTTATGACTAAATT
ACGTAGTCATAAAACATATCGTGATTCAGAACATACAATGAGTGTATTAACAA
TTACTTCAAACGTTGTATACGGTAAGAAAACCTGGTAACACACCAGACGGACGT
AAAGCTGGCGAACCATTTGCACCAGGTGCAAACCCAATGCATGGCCGTGACC
AAAAAGGTGCATTATCTTCATTAAGTTCTGTAGCTAAGATCCCTTACGATTGCT
GTAAAGATGGTATTTCAAATACATTCAGTATCGTACCAAATCATTAGGTAAA
GAACCAGAAGATCAAACCGTAACTTAAGTAGTATGTTAGATGGTTACGCAAT
GCAATGTGGTCACCCTTAAATATTAACGTATTTAACCGTGAAACATTAATAG
ATGCAATGGAACATCCAGAAGAATATCCACAGTTAAACAATCCGTGTATCTGGT
TACGCTGTAACTTCATTAATTAACACGTGAACAACAATTAGATGTAATTTCT
CGTACATTCCATGAAAGTATGTAA
(SEQ ID NO:431)

FIG. 86

ATGTTAGAAACAAATAAAAATCATGCAACAGCTTGGCAAGGATTTAAAATG
GAAGATGGAACAGACACGTAGATGTAAGAGAGTTTATCCAATTAACCTACAC
TCTTTATGAAGGTAATGATTCATTTTTAGCAGGACCAACAGAAGCAACTTCTA
AACTTTGGGAACAAGTAATGCAGTTATCGAAAGAAGAACGTGAACGTGGCGG
CATGTGGGATATGGACACGAAAGTAGCTTCAACAATCACATCTCATGATGCTG
GTTATTTAGACAAAGATTTAGAAACAATTGTAGGTGTACAACTGAAAAGCCA
TTCAAACGTTCAATGCAACCATTCCGGTGGTATTCGTATGGCGAAAGCAGCTTG
TGAAGCTTACGGTTACGAATTAGACGAAGAACTGAAAAAATCTTTACAGATT
ATCGTAAAACACATAACCAAGGTGTATTCGATGCATATTCTAGAGAAATGTTG

AACTGCCGTAAAGCAGGTGTAATCACTGGTTTACCTGATGCATACGGACGTGG
ACGTATTATCGGTGACTATCGTCGTGTAGCTTTATATGGTGTAGATTTCTTAAT
GGAAGAAAAAATGCACGACTTCAACACGATGTCTACAGAAATGTCAGAAGAT
GTAATTCGTTTACGTGAAGAATTATCAGAACAATATCGTGCATTAAGAATT
AAAAGAACTTGGACAAAAATATGGTTTCGATTTAAGCCGTCCAGCAGAAAAC
TTCAAAGAAGCAGTTCAATGGTTATACTTAGCATACTTGGCTGCAATTAAGA
ACAAAACGGTGCAGCAATGAGTTTAGGTCGTACATCAACATTCTTAGATATCT
ATGCTGAACGTGACCTTAAAGCAGGCGTTACTGAAAGCGAAGTTCAAGA
AATTATTGACCACTTCATCATGAAATTACGTATTGTTAAATTTGCTCGTACACC
TGATTACAATGAATTATTCTCTGGAGACCCAACTTGGGTAAGTGAATCTATCG
GTGGTGTAGGTATTGACGGACGTCCACTTGTACGAAAACTCATTCCGTTTCT
TACTCATTAGATAACTTAGGTCCAGCTCCAGAACCAAATAACAGTATTA
TGGTCAGTACGTTTACCTGACAACTTCAAAACATACTGTGCAAAAATGAGTAT
TAAACAAGTTCTATCCAATATGAAAATGATGACATTATGCGCGAAAGCTATG
GCGATGACTATGGTATCGCATGTTGTGTATCAGCGATGACAATTGGTAAACAA
ATGCAATTCTTCGGTGCACGTGCGAACTTAGCTAAAACATTACTTTACGCAAT
CAATGGTGGTAAAGATGAAAAATCTGGTGCACAAGTTGGTCCAACTTCGAA
GGTATTAACAGCGAAGTATTAGAATATGACGAAGTATTCAAGAAATTTGATCA
AATGATGGATTGGCTAGCAGGTGTTACATTAACTCATTAAATGTTATTTACTA
CATGCACGATAAATACAGCTATGAACGTATTGAAATGGCATTACATGATACAG
AAATTGTACGTACAATGGCAACAGGTATCGCTGGTTTATCAGTAGCAGCTGAC
TCATTATCTGCAATTAATATGCACAAGTTAAACCAATTCGTAACGAAGAAGG
TCTTGTAGTAGACTTTGAAATCGAAGGCGACTTCCCTAAATACGGTAACAATG
ACGACCGTGTAGATGATATCGCAGTTGATTTAGTAGAACGCTTCATGACTAAA
TTACGTAGTCATAAAACATATCGTGATTCAGAACATACAATGAGTGTATTAAC
AATTACTTCAAACGTTGTATACGGTAAGAAAACCTGGTAACACACCAGACGGA
CGTAAAGCTGGCGAACCATTTGCTCCAGGTGCAAACCCAATGCATGGCCGTGA
CCAAAAAGGTGCATTATCTTCATTAAGTTCTGTAGCTAAGATCCCCTACGATTG
CTGTAAGATGGTATTTCAAATACATTCAGTATCGTACCAAAAATCATTAGGTA
AAGAACCAGAAGATCAAACCGTAACTTAACTAGTATGTTAGATGGTTACGC
AATGCAATGTGGTCAACCACTTAAATATTAACGTATTTAACCGTGAAACATTAA
TAGATGCAATGGAACATCCAGAAGAATATCCACAGTTAACAATCCGTGTATCT

GGTTACGCTGTTAACTTCATTAAATTAACACGTGAACAACAATTAGATGTAAT
TTCTCGTACATTCCATGAAAGTATGTAA
(SEQ ID NO:432)

FIG. 87

ATGTTAGAAACAAATAAAAATCATGCAACAGCTTGGCAAGGATTTAAAAATG
GAAGATGGAACAGACACGTAGATGTAAGAGAGTTTATCCAATTAACACTACAC
TCTTTATGAAGGTAATGATTCATTTTTAGCAGGACCAACAGAAGCAACTTCTA
AACTTTGGGAACAAGTAATGCAGTTATCGAAAGAAGAACGTGAACGTGGCGG
CATGTGGGATATGGACACGAAAGTAGCTTCAACAATCACATCTCATGATGCTG
GTTATTTAGACAAAGATTTAGAAACAATTGTAGGTGTACAACTGAAAAGCCA
TTCAAACGTTCAATGCAACCATTCCGGTGGTATTCGTATGGCGAAAGCAGCTTG
TGAAGCTTACGGTIACGAATTAGACGAAGAACTGAAAAAATCTTTACAGATT
ATCGTAAAACACATAACCAAGGTGTATTTCGATGCATATTCTAGAGAAATGTTG
AACTGCCGTAAAGCAGGTGTAATCACTGGTTTACCTGATGCATACGGGCGTGG
ACGTATTATCGGTGACTATCGTCGTGTAGCTTTATATGGTGTAGATTTCTTAAT
GGAAGAAAAAATGCACGACTTCAACACGATGTCTACAGAAATGTCAGAAGAT
GTAATTCGTTTACGTGAAGAATTATCAGAACAATATCGTGCATTAAGAATT
AAAAGAAGCTTGGACAAAAATATGGTTTCGATTTAAGCCGTCAGCAGAAAAC
TTCAAAGAAGCAGTTCAATGGTTATACTTAGCATACCTTGCTGCAATTAAGA
ACAAAACGGTGCAGCAATGAGTTTAGGTCGTACATCAACATTCTTAGATATCT
ATGCTGAACGTGACCTTAAAGCAGGTGTTATTACTGAAAGCGAAGTTCAAGAA
ATTATTGACCACTTCATCATGAAATTACGTATTGTAAATTTGCTCGTACACCT
GATTACAATGAATTATTCTCTGGAGACCCAACTTGGGTAAGTGAATCTATCGG
TGGTGTAGGTATTGACGGACGTCCACTTGTTACGAAAAACTCATTCCGTTTCTT
ACACTCATTAGATAACTTAGGTCCAGCACCAGAACCAAACCTAACAGTATTAT
GGTCAGTACGTTTACCAGACAACCTTCAAACATACTGTGCAAAAATGAGTATT
AAAACAAGTTCTATCCAATATGAAAATGATGACATTATGCGTGAAAGCTATGG
CGATGACTATGGTATCGCATGTTGTGTATCAGCGATGACAATTGGTAAACAAA
TGCAATTCCTCGGTGCACGTGCGAACTTAGCTAAAACATTACTTTACGCTATCA
ATGGTGGTAAAGATGAAAAATCTGGTGCACAAGTTGGTCCAAACTTCGAAGG
TATTAACAGCGAAGTATTAGAATATGACGAAGTATTCAAGAAATTTGATCAAA
TGATGGATTGGCTAGCAGGTGTTTACATTAACCTATTAATGTTATTCACTACA
TGCACGATAAATACAGCTATGAACGTATTGAAATGGCATTACATGATACAGAA

ATTGTACGTACAATGGCAACAGGTATCGCTGGTTTATCAGTAGCAGCTGACTC
ATTATCTGCAATTAATATGCACAAGTTAAACCAATTCGTAACGAAGAAGGTC
TTGTAGTAGACTTTGAAATCGAAGGCGACTTCCCTAAATACGGTAACAATGAC
GACCGTGTAGATGATATCGCAGTTGATTTAGTAGAACGCTTTATGACTAAATT
ACGTAGTCATAAAACATATCGTGATTCAGAACATACAATGAGTGTATTAACAA
TTACTTCAAACGTTGTATACGGTAAGAAAACCTGGTAACACACCAGACGGACGT
AAAGCTGGCGAACCATTTGCACCAGGTGCAAACCCAATGCATGGCCGTGACC
AAAAAGGTGCATTATCTTCATTAAGTTCTGTAGCTAAGATTCCTTACGATTGCT
GTAAAGATGGTATTTCAAATACATTCAGTATCGTACCAAATCATTAGGTAAA
GAACCAGAAGATCAAACCGTAACTTAAGTATGTTAGATGGTTACGCAAT
GCAATGTGGTCAACCTTAAATATTAACGTATTTAACCGTGAAACATTAATAG
ATGCAATGGAACATCCAGAAGAATATCCACAGTTAACAATCCGTGTATCTGGT
TACGCTGTAACTTCATTAATTAACACGTGAACAACAATTAGATGTAATTTCT
CGTACATTCCATGAAAGTATGTAA

(SEQ ID NO:433)

FIG. 88

ATGTTAGAAACAAATAAAAATCATGCAACAGCTTGGCAAGGATTTAAAAATG
GAAGATGGAACAGACACGTAGATGTAAGAGAGTTTATCCAATTAACCTACAC
TCTTTATGAAGGTAATGATTCATTTTTAGCAGGACCAACAGAAGCAACTTCTA
AACTTTGGGAACAAGTAATGCAGTTATCGAAAGAAGAACGTGAACGTGGCGG
CATGTGGGATATGGACACGAAAGTAGCTTCAACAATCACATCTCATGATGCTG
GTTATTTAGACAAAGATTTAGAAACAATTGTAGGTGTACAACTGAAAAGCCA
TTCAAACGTTCAATGCAACCATTCCGGTGGTATTCGTATGGCGAAAGCAGCTTG
TGAAGCTTACGGTTACGAATTAGACGAAGAACTGAAAAAATCTTTACAGATT
ATCGTAAAACACATAACCAAGGTGTATTCGATGCATATCTAGAGAAATGTTG
AACTGCCGTAAAGCAGGTGTAATCACTGGTTTACCTGATGCATACGGACGTGG
ACGTATTATCGGTGACTATCGTCGTGTAGCTTTATATGGTGTAGATTTCTTAAT
GGAAGAAAAAATGCACGACTTCAACACGATGTCTACAGAAATGTCAGAAGAT
GTAATTCGTTTACGTGAAGAATTATCAGAACAATATCGTGCATTAAAAGAATT
AAAAGAACTTGGACAAAAATATGGTTTCGATTTAAGCCGTCCAGCAGAAAAC
TTCAAAGAAGCAGTTCAATGGTTATACTTAGCATACTTGCTGCAATTAAGA
ACAAAACGGTGCAGCAATGAGTTTAGGTCGTACATCAACATTCTTAGATATCT
ATGCTGAACGTGACCTTAAAGCAGGCGTTATTACTGAAAGCGAAGTTCAAGA

AATTATTGACCACTTCATCATGAAATTACGIATTGTTAAATTTGCTCGTACACC
TGATTACAATGAATTATTCTCTGGAGACCCAACCTGGGTAACCTGAATCTATCG
GTGGTGTAGGTATTGACGGACGTCCACTTGTTACGAAAAACTCATTCCGTTTCT
TACACTCATTAGATAACTTAGGTCCAGCTCCAGAACCAAACCTAACAGTATTA
TGGTCAGTACGTTTACCTGACAACCTTCAAACATACTGTGCAAAAATGAGTAT
TAAAACAAGTTCTATCCAATATGAAAATGATGACATTATGCGTGAAAGCTATG
GCGATGACTATGGTATCGCATGTTGTGTATCAGCGATGACAATTGGTAAACAA
ATGCAATCTTCCGGTGCACGTGCGAACTTAGCTAAAACATTACTTTACGCTATC
AATGGTGGTAAAGATGAAAAATCTGGTGCACAAGTTGGTCCAAACTTCGAAG
GTATTAACAGCGAAGTATTAGAATATGACGAAGTATTCAAGAAATTTGATCAA
ATGATGGATTGGCTAGCAGGTGTTACATTAACCTATTAAATGTTATTCACTAC
ATGCACGATAAATACAGCTATGAACGTATTGAAATGGCATTACATGATACAGA
AATTGTACGTACAATGGCAACAGGTATCGCTGGTTTATCAGTAGCAGCTGACT
CATTATCTGCAATTAATATGCACAAGTTAAACCAATTCGTAACGAAGAAGGT
CTTGTAGTAGACTTTGAAATCGAAGGCGACTTCCCTAAATACGGTAACAATGA
CGACCGTGTAGATGATATCGCAGTTGATTTAGTAGAACGCTTTATGACTAAAT
TACGTAGTCATAAAACATATCGTGATTCAGAACATACAATGAGTGTATTAACA
ATTACTTCAAACGTTGTATACGGTAAGAAAACCTGGTAACACACCAGACGGAC
GTAAAGCTGGCGAACCATTGACCAGGTGCAAACCCAATGCATGGCCGTGA
CCAAAAAGGTGCATTATCTTCATTAAGTTCTGTAGCTAAGATCCCTTACGATTG
CTGTAAAGATGGTATTTCAAATACATTCAGTATCGTACCAAATCATTAGGTA
AAGAACCAGAAGATCAAACCGTAACTTAACTAGTATGTTAGATGGTTACGC
AATGCAATGTGGTCACCACTTAAATATTAACGTATTTAACCGTGAAACATTA
TAGATGCAATGGAACATCCAGAAGAATATCCACAGTTAACAATCCGTGTATCT
GGTTACGCTGTAACTTCATTAATAACACGTGAACAACAATTAGATGTAAT
TTCTCGTACATTCCATGA AAGTATGTAA

(SEQ ID NO:434)

FIG. 89

ATGTTAGAAACAAATAAAAATCATGCAACAGCTTGGCAAGGATTTAAAAATG
GAAGATGGAACAGACACGTAGATGTAAGAGAGTTTATCCAATTAACCTACAC
TCTTTATGAAGGTAATGATTCATTTTTAGCAGGACCAACAGAAGCAACTTCTA
AACTTTGGGAACAAGTAATGCAGTTATCGAAAGAAGAACGTGAACGTGGCGG
CATGTGGGATATGGACACGAAAGTAGCTTCAACAATCACATCTCATGATGCTG

GTTATTTAGACAAAGATTTAGAAACAATTGTAGGTGTACAAACTGAAAAGCCA
TTCAAACGTTCAATGCAACCATTTCGGTGGTATTCGTATGGCGAAAAGCAGCTTG
TGAAGCTTACGGTTACGAATTAGACGAAGAACTGAAAAAATCTTTACAGATT
ATCGTAAAACACATAACCAAGGTGTATTCGATGCATATTCTAGAGAAATGTTG
AACTGCCGTAAAGCAGGTGTAATCACTGGTTTACCTGATGCATACGGACGTGG
ACGTATTATCGGTGACTATCGTCGTGTAGCTTTATATGGTGTAGATTTCTTAAT
GGAAGAAAAAATGCACGACTTCAACACGATGTCTACAGAAATGTCAGAAGAT
GTAATTCGTTTACGTGAAGAATTATCAGAACAATATCGTGCATTAAGAATT
AAAAGAAGTTGGACAAAAATATGGTTTCGATTTAAGCCGTCCAGCAGAAAAAC
TTCAAAGAAGCAGTTCAATGGTTATACTTAGCATACCTTGCTGCAATTAAGA
ACAAAACGGTGCAGCAATGAGTTTAGGTCGTACATCAACATTCTTAGATATCT
ATGCTGAACGTGACCTTAAAGCAGGCGTTATTACTGAAAGCGAAGTTCAAGA
AATTATTGACCACTTCATCATGAAATTACGTATTGTTAAATTTGCTCGTACACC
TGATTACAATGAATTATTCTCTGGAGACCCAACTGGGTAAGTGAATCTATCG
GTGGTGTAGGTATTGACGGACGTCCACTTGTTACGAAAAACTCATTCCGTTTCT
TACTCATTAGATAACTTAGGTCCAGCTCCAGAACCAAACCTAACAGTATTA
TGGTCAGTACGTTTACCTGACAACTTCAAAACATACTGTGCAAAAAATGAGTAT
TAAACAAGTTCTATCCAATATGAAAATGATGACATTATGCGTGAAAGCTATG
GCGATGACTATGGTATCGCATGTTGTGTATCAGCGATGACAATTGGTAAACAA
ATGCAATTCCTTCGGTGCACGTGCGAACTTAGCTAAAACATTACTTTACGCTATC
AATGGTGGTAAAGATGAAAAATCTGGTGCACAAGTTGGTCCAAACTTCGAAG
GTATTAACAGCGAAGTATTAGAATATGACGAAGTATTCAAGAAATTTGATCAA
ATGATGGATTGGCTAGCAGGTGTTACATTAACTCATTAAATGTTATTCACTAC
ATGCACGATAAATACAGCTATGAACGTATTGAAATGGCATTACATGATACAGA
AATTGTACGTACAATGGCAACAGGTATCGCTGGTTTATCAGTAGCAGCTGACT
CATTATCTGCAATTAATATGCACAAGTTAAACCAATTCGTAACGAAGAAGGT
CTTGTAGTAGACTTTGAAATCGAAGGCGACTTCCCTAAATACGGTAACAATGA
CGACCGTGTAGATGATATTGCAGTTGATTTAGTAGAACGCTTCATGACTAAAT
TACGTAGTCATAAAACATATCGTGATTCAGAACATAACAATGAGTGTATTAACA
ATTACTTCAAACGTTGTATACGGTAAGAAAACTGGTAAACACACCAGACGGAC
GTAAAGCTGGCGAACCATTTGCTCCAGGTGCAAACCAATGCATGGCCGTGAC
CAAAAAGGTGCATTATCTTCATTAAGTTCTGTAGCTAAGATCCCTTACGATTGC
TGTAAGATGGTATTTCAAATACATTCAGTATCGTACCAAATCATTAGGTAA
AGAACCAGAAGATCAAAACCGTAACTTAACTAGTATGTTAGATGGTTACGCA

37/112

ATGCAATGTGGTCACCACTTAAATATTAACGTATTTAACCGTGAAACATTAAT
AGATGCAATGGAACATCCAGAAGAATATCCACAGTTAACAATCCGTGTATCTG
GTTACGCTGTAACTTCATTAATAACACGTGAACAACAATTAGATGTAATT
TCTCGTACATTCCATGAAAGTATGTAA

(SEQ ID NO:435)

FIG. 90

ATGTTAGAAACAAATAAAAATCATGCAACAGCTTGGCAAGGATTTAAAAATG
GAAGATGGAACAGACACGTAGATGTAAGAGAGTTTATCCAATTAACACTACAC
TCTTTATGAAGGTAATGATTCATTTTTAGCAGGACCAACAGAAGCAACTTCTA
AACTTTGGGAACAAGTAATGCAGTTATCGAAAGAAGAACGTGAACGTGGCGG
CATGTGGGATATGGACACGAAAGTAGCTTCAACAATCACATCTCATGATGCTG
GTTATTTAGACAAAGATTTAGAAACAATTGTAGGTGTACAACTGAAAAGCCA
TTCAAACGTTCAATGCAACCATTCCGGTGGTATTCGTATGGCGAAAGCAGCTTG
TGAAGCTTACGGTTACGAATTAGACGAAGAAACTGAAAAAATCTTTACAGATT
ATCGTAAAACACATAACCAAGGTGTATTTCGATGCATATTCTAGAGAAATGTTG
AACTGCCGTAAAGCAGGTGTAATCACTGGTTTACCTGATGCATACGGACGTGG
ACGTATTATCGGTGACTATCGTCGTGTAGCTTTATATGGTGTAGATTTCTTAAT
GGAAGAAAAAATGCACGACTTCAACACGATGTCTACAGAAATGTCAGAAGAT
GTAATTCGTTTACGTGAAGAATTATCAGAACAATATCGTGCATTAAGAATT
AAAAGAACTTGGACAAAAATATGGTTTCGATTTAAGCCGTCCAGCAGAAAAC
TTCAAAGAAGCAGTTCAATGGTTATACTTAGCATACCTTGCTGCAATTAAGA
ACAAAACGGTGCAGCAATGAGTTTAGGTTCGTACATCAACATTCTTAGATATCT
ATGCTGAACGTGACCTTAAAGCAGGCGTTATTACTGAAAGCGAAGTTCAAGA
AATTATTGACCACTTCATCATGAAATTACGTATTGTTAAATTTGCTCGTACACC
TGATTACAATGAATTATFCTCTGGAGACCCAACCTGGGTAACCTGAATCTATCG
GTGGTGTAGGTATTGACGGACGTCCACTTGTTACGAAAAACTCATTCCGTTTCT
TACACTCATTAGATAACTTAGGTCCAGCTCCAGAACCAAACCTTAACAGTATTA
TGGTCAGTACGTTTACCTGACAACCTTCAAAACATACTGTGCAAAAATGAGTAT
TAAAACAAGTTCTATCCAATATGAAAATGATGACATTATGCGCGAAAGCTATG
GCGATGACTATGGTATCGCATGTTGTGTATCAGCGATGACAATTGGTAAACAA
ATGCAATTCCTCGGTGCAACGTGCGAACTTAGCTAAAACATTACTTTACGCAAT
CAATGGTGGTAAAGATGAAAAATCTGGTGCACAAGTTGGTCCAAACTTCGAA
GGTATTAACAGCGAAGTATTAGAATATGACGAAGTATTCAAGAAATTTGATCA

AATGATGGATTGGCTAGCAGGTGTTTACATTAACTCATTAAATGTTATTCACTA
CATGCACGATAAATACAGCTATGAACGTATTGAAATGGCATTACATGATACAG
AAATTGTACGTACAATGGCAACAGGTATCGCTGGTTTATCAGTAGCAGCTGAC
TCATTATCTGCAATTAATATGCACAAGTTAAACCAATTCGTAACGAAGAAGG
TCTTGTAGTAGACTTTGAAATCGAAGGCGACTTCCCTAAATACGGTAACAATG
ACGACCGTGTAGATGATATCGCAGTTGATTTAGTAGAACGCTTCATGACTAAA
TTACGIAGTCATAAAACATATCGTGATTCAGAACATAACAATGAGTGTATTAAC
AATTACTTCAAACGTTGTATACGGTAAGAAAACCTGGTAACACACCAGACGGA
CGTAAAGCTGGCGAACCATTTGCTCCAGGTGCAAACCCAATGCATGGCCGTGA
CCAAAAAGGTGCATTATCTTCATTAAGTTCGTAGCTAAGATCCCTTACGATTG
CTGTAAAGATGGTATTTCAAATACATTCAGTATCGTACCAAATCATTAGGTA
AAGAACCAGAAGATCAAACCGTAACTTAAGTATGTTAGATGGTTACGC
AATGCAATGTGGTCACCACTTAAATATTAACGTATTTAACCGTGAAACATTAA
TAGATGCAATGGAACATCCAGAAGAATATCCACAGTTAACAATCCGTGTATCT
GGTTACGCTGTAACTTCATTAATAACACGTGAACAACAATTAGATGTAAT
TTCTCGTACATTCATGAAAGTATGTAA

(SEQ ID NO:436)

FIG. 91

ATGTTAGAAACAAATAAAAATCATGCAACAGCTTGGCAAGGATTTAAAAATG
GAAGATGGAACAGACACGTAGATGTAAGAGAGTTTATCCAATTAACCTACAC
TCTTTATGAAGGTAATGATTCATTTTTAGCAGGACCAACAGAAGCAACTTCTA
AACTTTGGGAACAAGTAATGCAGTTATCGAAAGAAGAACGTGAACGTGGCGG
CATGTGGGATATGGACACGAAAGTAGCTTCAACAATCACATCTCATGATGCTG
GTTATTTAGACAAAGATTTAGAAACAATTGTAGGTGTACAAACTGAAAAGCCA
TTCAAACGTTCAATGCAACCATTCCGGTGGTATTCGTATGGCGAAAGCAGCTTG
TGAAGCTTACGGTTACGAATTAGACGAAGAACTGAAAAAATCTTTACAGATT
ATCGTAAAACACATAACCAAGGTGATTTCGATGCATATTCTAGAGAAATGTTG
AACTGCCGTAAAGCAGGTGTAATCACTGGTTTACCTGATGCATACGGACGTGG
ACGTATTATCGGTGACTATCGTCGTGTAGCTTTATATGGTGTAGATTTCCTAAT
GGAAGAAAAAATGCACGACTTCAACACGATGTCTACAGAAATGTCAGAAGAT
GTAATTCGTTTACGTGAAGAATTATCAGAACAATATCGTGCATTAAGAATT
AAAAGAACTTGGACAAAAATATGGTTTCGATTTAAGCCGTCCAGCAGAAAAC
TTCAAAGAAGCAGTTCAATGGTTATACTTAGCATACCTTGCTGCAATTAAGA

ACAAAACGGTGCAGCAATGAGTTTAGGTCGTACATCAACATTCTTAGATATCT
ATGCTGAACGTGACCTTAAAGCAGGCGTTATTACTGAAAGCGAAGTTCAAGA
AATTATTGACCACTTCATCATGAAATTACGTATTGTAAATTTGCTCGTACACC
TGATTACAATGAATTATTCTCTGGAGACCCAACTTGGGTAACCTGAATCTATCG
GTGGTGTAGGTATTGACGGACGTCCACTTGTTACGAAAACTCATTCCGTTTCT
TACACTCATTAGATAACTTAGGTCCAGCTCCAGAACCAAACCTTAACAGTATTA
TGGTCAGTACGTTTACCTGACAACCTTCAAAACATACTGTGCAAAAATGAGTAT
TAAAACAAGTTCTATCCAATATGAAAATGATGACATTATGCGTGAAAGCTATG
GCGATGACTATGGTATCGCATGTTGTGTATCAGCGATGACAATTGGTAAACAA
ATGCAATTCCTCGGTGCACGTGCGAACTTAGCTAAAACATTACTTTACGCTATC
AATGGTGGTAAAGATGAAAAATCTGGTGCACAAGTTGGTCCAAACTTCGAAG
GTATTAACAGCGAAGTATTAGAATATGACGAAGTATTCAAGAAATTTGATCAA
ATGATGGATTGGCTAGCAGGTGTTTACATTAACCTCATTAAATGTTATTCACTAC
ATGCACGATAAAATACAGCTATGAACGTATTGAAATGGCATTACATGATACAGA
AATTGTACGTACAATGGCAACAGGTATCGCTGGTTTATCAGTAGCAGCTGACT
CATTATCTGCAATTAATATGCACAAGTTAAACCAATTCGTAACGAAGAAGGT
CTTGATAGTACTTTGAAATCGAAGGCGACTTCCCTAAATACGGTAACAATGA
CGACCGTGTAGATGATATTGCAGTTGATTTAGTAGAACGTTTCATGACTAAAT
TACGTAGTCATAAAACATATCGTGATTCAGAACATACAATGAGTGTATTAACA
ATTACTTCAAACGTTGTATACGGTAAGAAAACCTGGTAACACACCAGACGGAC
GTAAAGCTGGCGAACCATTTGCTCCAGGTGCAAACCCAATGCATGGCCGTGAC
CAAAAAGGTGCATTATCTTCATTAAGTTCTGTAGCTAAGATCCCTTACGATTGC
TGTAAGATGGTATTTCAAATACATTCAGTATCGTACCAAAATCATTAGGTAA
AGAACCAGAAGATCAAACCGTAACTTAACTAGTATGTTAGATGGTTACGCA
ATGCAATGTGGTCACCACTTAAATATTAACGTATTTAACCGTGAAACATTAAT
AGATGCAATGGAACATCCAGAAGAATATCCACAGTTAACAATCCGTGTATCTG
GTTACGCTGTTAACTTCATTAAATTAACACGTGAACAACAATTAGATGTAATT
TCTCGTACATTCCATGAAAGTATGTAA

(SEQ ID NO:437)

FIG. 92

ATGTTAGAAACAAATAAAAATCATGCAACAGCTTGGCAAGGATTTAAAAATG
GAAGATGGAACAGACACGTAGATGTAAGAGAGTTTATCCAATTAACCTACAC
TCTTTATGAAGGTAATGATTCATTTTTAGCAGGACCAACAGAAGCAACTTCTA

AACTTTGGGAACAAGTAATGCAGTTATCGAAAGAAGAACGTGAACGTGGCGG
CATGTGGGATATGGACACGAAAGTAGCTTCAACAATCACATCTCATGATGCTG
GTTATTTAGACAAAAGATTTAGAAAACAATTGTAGGTGTACAAACTGAAAAGCCA
TTCAAACGTTCAATGCAACCATTCCGGTGGTATTCGTATGGCGAAAGCAGCTTG
TGAAGCTTACGGTTACGAATTAGACGAAGAACTGAAAAAATCTTTACAGATT
ATCGTAAAACACATAACCAAGGTGTATTTCGATGCATATTCTAGAGAAATGTTG
AACTGCCGTAAAGCAGGTGTAATCACTGGTTTACCTGATGCATACGGACGTGG
ACGTATTATCGGTGACTATCGTCGTGTAGCTTTATATGGTGTAGATTTCTTAAT
GGAAGAAAAAATGCACGACTTCAACACGATGTCTACAGAAATGTCAGAAGAT
GTAATTCGTTTACGTGAAGAATTATCAGAACAATATCGTGCATTA AAAAGAATT
AAAAGA ACTTTGGACAAAAATATGGTTTCGATTTAAGCCGTCCAGCAGAAAAC
TTCAAAGAAGCAGTTCAATGGTTATACTTAGCATACCTTGCTGCAATTAAGA
ACAAAACGGTGCAGCAATGAGTTTAGGTCGTACATCAACATTCTTAGATATCT
ATGCTGAACGTGACCTTAAAGCAGGCGTTATTACTGAAAGCGAAGTCAAGA
AATTATTGACCACTTCATCATGAAATTACGTATTGTTAAATTTGCTCGTACACC
TGATTACAATGAATTATTCTCTGGAGACCCAACTTGGGTA ACTGAATCTATCG
GTGGTGTAGGTATTGACGGACGTCCACTTGTACGAAAACTCATTCCGTTTCT
TACACTCATTAGATAACTTAGGTCCAGCTCCAGAACCAA ACTTAACAGTATTA
TGGTCAGTACGTTTACCTGACA ACTTCAAACATACTGTGCAAAAAATGAGTAT
TAAAACAAGTTCTATCCAATATGAAAATGATGACATTATGCGTGAAAGCTATG
GCGATGACTATGGTATCGCATGTTGTGTATCAGCGATGACAATTGGTAAACAA
ATGCAATTCCTTCGGTGCACGTGCGAACTTAGCTAAAACATTACTTTACGCTATC
AATGGTGGTAAAGATGAAAAATCTGGTGCACAAGTTGGTCCAAACTTCGAAG
GTATTAACAGCGAAGTATTAGAATATGACGAAGTATTCAAGAAATTTGATCAA
ATGATGGATTGGCTAGCAGGTGTTTACATTA ACTCATTAAATGTTATTCACTAC
ATGCACGATAAATACAGCTATGAACGTATTGAAATGGCATTACATGATACAGA
AATTGTACGTACAATGGCAACAGGTATCGCTGGTTTATCAGTAGCAGCTGACT
CATTATCTGCAATTA AATATGCACAAGTTAAACCAATTCGTAACGAAGAAGGT
CTTGTAGTAGACTTTGAAATCGAAGGCGACTTCCCTAAATACGGTAACAATGA
CGACCGTGTAGATGATATTGCAGTTGATTTAGTAGAACGCTTCATGACTAAAT
TACGTAGTCATAAAACATATCGTGATTCAGAACATA CAATGAGTGTATTAACA
ATTACTTCAAACGTTGTATACGGTAAGAAAACTGGTAACACACCAGACGGAC
GTAAAGCTGGCGAACCATTTGCTCCAGGTGCAAACCCAATGCATGGCCGTGAC
CAAAAAGGTGCATTATCTTCATTAAGTTCTGTAGCTAAGATCCCTTACGATTGC

41/112

TGTAAAGATGGTATTTCAAATACATTCAGTATCGTACCAAATCATTAGGTAA
AGAACCAGAAGATCAAAACCGTAACTTAAGTATGTTAGATGGTTACGCA
ATGCAATGTGGTCACCACTTAAATATTAACGTATTTAACCGTGAAACATTAAT
AGATGCAATGGAACATCCAGAAGAATATCCACAGTTAACAATCCCGTGTATCTG
GTTACGCTGTTAACTTCATTAATTAACACGTGAACAACAATTAGATGTAATT
TCTCGTACATTCATGAAAGTATGTAA

(SEQ ID NO:438)

FIG. 93

ATGTTAGAAACAAATAAAAATCATGCAACAGCTTGGCAAGGATTTAAAAATG
GAAGATGGAACAGACACGTAGATGTAAGAGAGTTTATCCAATTAAGTACAC
TCTTTATGAAGGTAATGATTCATTTTTAGCAGGACCAACAGAAGCAACTTCTA
AACTTTGGGAACAAGTAATGCAGTTATCGAAAGAAGAACGTGAACGTGGCGG
CATGTGGGATATGGACACGAAAGTAGCTTCAACAATCACATCTCATGATGCTG
GTIATTTAGACAAAGATTTAGAAACAATTGTAGGTGTACAACTGAAAAGCCA
TTCAAACGTTCAATGCAACCATTCCGGTGGTATTCGTATGGCGAAAGCAGCTTG
TGAAGCTTACGGTTACGAATTAGACGAAGAACTGAAAAAATCTTTACAGATT
ATCGTAAAACACATAACCAAGGTGTATTCGATGCATATTCTAGAGAAATGTTG
AACTGCCGTAAAGCAGGTGTAATCACTGGTTTACCTGATGCATACGGACGTGG
ACGTATTATCGGTGACTATCGTCGTGTAGCTTTATATGGTGTAGATTTCTTAAT
GGAAGAAAAAATGCACGACTTCAACACGATGTCTACAGAAATGTCAGAAGAT
GTAATTCGTTTACGTGAAGAATTATCAGAACAATATCGTGCATTAAGAATT
AAAAGAACTTGGACAAAAATATGGTTTCGATTTAAGCCGTCCAGCAGAAAAC
TTCAAAGAAGCAGTTCAATGGTTACTTAGCATACCTTGCTGCAATTAAGA
ACAAAACGGTGCAGCAATGAGTTTAGGTCGTACATCAACATTCTTAGATATCT
ATGCTGAACGTGACCTTAAAGCAGGCGTTATTACTGAAAGCGAAGTTCAAGA
AATTATTGACCACTTCATCATGAAATTACGTATTGTTAAATTTGCTCGTACACC
TGATTACAATGAATTATTCTCTGGAGACCCAACCTGGGTAACCTGAATCTATCG
GTGGTGTAGGTATTGACGGACGTCCACTTGTACGAAAAACTCATTCCGTTTCT
TACACTCATTAGATAACTTAGGTCCAGCTCCAGAACCAAACCTAACAGTATTA
TGGTCAGTACGTTTACCTGACAACTTCAAAACATACTGTGCAAAAATGAGTAT
TAAAACAAGTTCTATCCAATATGAAAATGATGACATTATGCGTGAAAGCTATG
GCGATGACTATGGTATCGCATGTTGTGTATCAGCGATGACAATTGGTAAACAA
ATGCAATTCTTCGGTGCACGTGCGAACTTAGCTAAAACATTACTTTACGCTATC

42/112

AATGGTGGTAAAGATGAAAAATCTGGTGCACAAGTTGGTCCAAACTTCGAAG
GTATTAACAGCGAAGTATTAGAATATGACGAAGTATCAAGAAATTTGATCAA
ATGATGGATTGGCTAGCAGGTGTTACATTAACCTATTAAATGTTATCACTAC
ATGCACGATAAATACAGCTATGAACGTATTGAAATGGCATTACATGATACAGA
AATTGTACGTACAATGGCAACAGGTATCGCTGGTTTATCAGTAGCAGCTGACT
CATTATCTGCAATTAATATGCACAAGTTAAACCAATTCGTAACGAAGAAGGT
CTTGTAGTAGACTTTGAAATCGAAGGCGACTTCCCTAAATACGGTAACAATGA
CGACCGTGTAGATGATATTGCAGTTGATTTAGTAGAACGCTTCATGACTAAAT
TACGTAGTCATAAAACATATCGTGATTCAGAACATACAATGAGTGTATTAACA
ATTACTTCAAACGTTGTATACGGTAAGAAAACCTGGTAACACACCAGACGGAC
GTAAAGCTGGCGAACCATTTGCTCCAGGTGCAAACCCAATGCATGGCCGTGAC
CAAAAAGGTGCATTATCTTCATTAAGTTCTGTAGCTAAGATCCCTTACGATTGC
TGTAAGATGGTATTTCAAATACATTCAGTATCGTACCAAATCATTAGGTAA
AGAACCAGAAGATCAAACCGTAACTTAAGTATGTTAGATGGTTACGCA
ATGCAATGTGGTCACCACTTAAATATTAACGTATTTAACCGTGAAACATTAAT
AGATGCAATGGAACATCCAGAAGAATATCCACAGTTAACAATCCGTGTATCTG
GTTACGCTGTTAACTTCATTAATTAACACGTGAACAACAATTAGATGTAATT
TCTCGTACATTCCATGAAAGTATGTAA

(SEQ ID NO:439)

FIG. 94

ATGTTAGAAACAAATAAAAATCATGCAACAGCTTGGCAAGGATTTAAAAATG
GAAGATGGAACAGACACGTAGATGTAAGAGAGTTTATCCAATTAACCTACAC
TCTTTATGAAGGTAATGATTCATTTTTAGCAGGACCAACAGAAGCAACTTCTA
AACTTTGGGAACAAGTAATGCAGTTATCGAAAGAAGAACGTGAACGTGGCGG
CATGTGGGATATGGACACGAAAGTAGCTTCAACAATCACATCTCATGATGCTG
GTTATTTAGACAAAGATTTAGAAACAATTGTAGGTGTACAAACTGAAAAGCCA
TTCAAACGTTCAATGCAACCATTTCGGTGGTATTCGTATGGCGAAAGCAGCTTG
TGAAGCTTACGTTACGAATTAGACGAAGAACTGAAAAAATCTTTACAGATT
ATCGTAAAACACATAACCAAGGTGTATTCGATGCATATTCTAGAGAAATGTTG
AACTGCCGTAAGCAGGTGTAATCACTGGTTTACCTGATGCATACGGACGTGG
ACGTATTATCGGTGACTATCGTCGTGTAGCTTTATATGGTGTAGATTTCTTAAT
GGAAGAAAAAATGCACGACTTCAACACGATGTCTACAGAAATGTCAGAAGAT
GTAATTCGTTTACGTGAAGAATTATCAGAACAATATCGTGCATTAAGAATT

43/112

AAAAGAACTTGGACAAAAATATGGTTTCGATTTAAGCCGTCCAGCAGAAAAC
TTCAAAGAAGCAGTTCAATGGTTATACTTAGCATACCTTGCTGCAATTAAGA
ACAAAACGGTGCAGCAATGAGTTTAGGTCGTACATCAACATTCTTAGATATCT
ATGCTGAACGTGACCTTAAAGCAGGCGTTATTACTGAAAGCGAAGTTCAAGA
AATTATTGACCACTTCATCATGAAATTACGTATTGTAAATTTGCTCGTACACC
TGATTACAATGAATTATTCTCTGGAGACCCAACCTGGGTAACCTGAATCTATCG
GTGGTGTAGGTATTGACGGACGTCCACTTGTTACGAAAAACTCATTCCGTTTCT
TACACTCATTAGATAACTTAGGTCCAGCTCCAGAACCAAACCTTAACAGTATTA
TGGTCAGTACGTTTACCTGACAACCTTCAAACATACTGTGCAAAAATGAGTAT
TAAAACAAGTTCTATCCAATATGAAAATGATGACATTATGCGTGAAAGCTATG
GCGATGACTATGGTATCGCATGTTGTGTATCAGCGATGACAATTGGTAAACAA
ATGCAATTCTTCGGTGCACGTGCGAACTTAGCTAAAACATTACTTTACGCTATC
AATGGTGGTAAAGATGAAAAATCTGGTGCACAAGTTGGTCCAAACTTCGAAG
GTATTAACAGCGAAGTATTAGAATATGACGAAGTATTCAAGAAATTTGATCAA
ATGATGGATTGGCTAGCAGGTGTTTACATTAACCTCATTAAATGTTATTCACTAC
ATGCACGATAAAATACAGCTATGAACGTATTGAAATGGCATTACATGATACAGA
AATTGTACGTACAATGGCAACAGGTATCGCTGGTTTATCAGTAGCAGCTGACT
CATTATCTGCAATTAATATGCACAAGTTAAACCAATTCGTAACGAAGAAGGT
CTTGTAGTAGACTTTGAAATCGAAGGCGACTTCCCTAAATACGGTAACAATGA
CGACCGTGTAGATGATATCGCAGTTGATTTAGTAGAACGCTTTATGACTAAAT
TACGTAGTCATAAAACATATCGTGATTCAGAACATACAATGAGTGTATTAACA
ATTACTTCAAACGTTGTATACGGTAAGAAAACCTGGTAACACACCAGACGGAC
GTAAAGCTGGCGAACCATTTCACCAGGTGCAAACCCAATGCATGGCCGTGA
CCAAAAAGGTGCATTATCTTCATTAAGTTCTGTAGCTAAGATCCCTTACGATTG
CTGTAAAGATGGTATTTCAAATACATTCAGTATCGTACCAAATCATTAGGTA
AAGAACCAGAAGATCAAACCGTAACTTAACTAGTATGTTAGATGGTTACGC
AATGCAATGTGGTCACCACTTAAATATTAACGTATTTAACCGTGAAACATTAA
TAGATGCAATGGAACATCCAGAAGAATATCCACAGTTAACAATCCGTGTATCT
GGTTACGCTGTAACTTCATTAAATTAACACGTGAACAACAATTAGATGTAAT
TTCTCGTACATTCCATGAAAGTATGTAA

(SEQ ID NO:440)

FIG. 95

AAAAAAGAAAACAAGCAATTAACGTATACGACGGTTAAAGATATCGGGGATA
TGAACCCGCATGTTTACGGTGGATCGATGTCTGCTGAAAGTATGATATACGAG
CCGCTTGTACGTAACACGAAAGACGGGATTAAGCCTTACTAGCTAAAAAATG
GGGTGTGCTGAAGATGGGAAGACATACACGTTCCATTTGAGAGATGACGTTA
AATTCCATGATGGTACGCCATTTGATGCTGACGCAGTTAAGAAAAATATTGAC
GCAGTTCAAGAAAACAAAAAATTGCATTCTTGGTTAAAGATTTCAACATTAAT
TGACAATGTTAAAGTTAAAGATAAGTACACGGTTGAATTGAATTTGAAAGAA
GCATATCAACCTGCATTGGCTGAATTAGCGATGCCTCGTCCATATGTATTTGTG
TCTCCAAAAGACTTTAAAAACGGCACAACAAAAGATGGCGTTAAAAAGTTTCG
ATGGTACTGGTCCGTTTAAATTAGGTGAACACAAAAAAGATGAGTCTGCAGAC
TTTAACAAAAATGATCAATACTGGGGCGAAAAGTCTAAACTTAACAAAGTAC
AAGCAAAAAGTAATGCCTGCTGGTGAAACAGCATTCTATCAATGAAAAAAGG
TGAAACGAACTTTGCCTTACAGATGATGGAGGTACAGATAGCTTAGACAAA
GACTCTTTAAAACAATTGAAAGATACTGGTGACTATCAAGTTAAGCGTAGTCA
ACCTATGAATACGAAAATGTTAGTTGTCAATTCCTGGTAAAAAAGATAACGCTG
TCAGTGACAAAACAGTCAGACAAGCGATTGGTCATATGGTAAACAGAGATAA
AATTGCCAAAGAAATTTTAGATGGTCAAGAAAAACCAGCAACTCAATTATTTG
CGAAAATGTAACAGACATTAATTTGATATGCCAACACGTAAGTATGACCTT
AAAAAAGCAGAATCATTATTAGATGAAGCTGGTTGGAAGAAAGGTAAAGACA
GCGATGTTTCGTCAAAAAGATGGTAAAAACCTTGAAATGGCAATGTACTATGAC
AAAGGTTCTTCAAGTCAAAAAGAACAAGCAGAATACTTACAAGCAGAATTTA
AGAAAATGGGTATTAAGTTAAACATCAATGGCGAAACATCAGATAAAATTGC
TGAACGTCGTACTTCTGGTGATTATGACTTAATGTTCAACCAAACCTGGGGATT
ATTGTACGATCCACAAAGTACTATTGCAGCATTAAAGCGAAAAAATGGTATGA
AAGTGCAACATCAGGCATTGAGAATAAAGATAAAATATACAACAGCATTGAT
GACGCATTTAAAATCCAAAACGGTAAAGAGCGTTCAGACGCTTATAAAAAACA
TTTTGAAACAAGTTGATGATGAAGGTATCTTTATCCCTGTTTCACACGGTAGTA
TGACAGTTGTTGCGCCGAAAGATTTAGAAAAAGTATCATTACACAATCACAG
TACGAATTACCATTCAATGAAATGCAGTATAAATAA

(SEQ ID NO:441)

FIG. 96

ATGAGAAAACACTAACTAAAATGAGTGCAATGTTACTTGCATCAGGGCTAATTTT
AACTGGTTGTGGCGGTAATAAAGGTTTAGAGGAGAAAAAAGAAAACAAGCAA
TTAACGTATACGACGGTTAAAGATATCGGGGATATGAACCCGCATGTTTACGG
TGGATCGATGTCTGCTGAAAGTATGATATACGAGCCACTTGTACGTAACACGA
AAGATGGGATTAAGCCTTTATTAGCTAAAAAATGGGATGTTTCTGAAGATGGG
AAGACATATACATTCCATTTGAGAGATGACGTTAAATTCCATGATGGTACGCC
ATTTGATGCTGACGCAGTTAAGAAAAATATTGACGCGGTTCAAGAAAACAAA
AAATTGCATTCTTGGTTAAAGATTTCAACATTAATTGACAATGTTAAAGTTAA
AGATAAGTACACGGTTGAATTGAATTTGAAAGAAGCATATCAACCTGCATTGG
CTGAATTAGCGATGCCTCGTCCATATGTATTTGTGTCTCCAAAAGACTTTAAAA
ACGGCACAAACAAAAGATGGCGTTAAAAAGTTTCGATGGTACTGGTCCATTTAA
ATTAGGTGAACACAAAAAAGATGAGTCTGCAGACTTTAACAAAAATGATCAA
TACTGGGGCGAAAAGTCTAAACTTAACAAAGTACAAGCAAAAGTAATGCCTG
CTGGTGAAACAGCATTCTATCAATGAAAAAAGGTGAAACGAACTTTGCCTTC
ACAGATGATAGAGGTACAGATAGCTTAGACAAAGACTCTTTAAAACAATTGA
AAGATACAGGTGACTATCAAGTTAAGCGTAGTCAACCTATGAATACGAAAAT
GTTAGTTGTCAATTCTGGTAAAAAAGATAGCGCTGTCAGTGACAAAACAGTCA
GACAAGCGATTGGTCATATGGTAAACAGAGATAAAATTGCCAAAGAAATTTT
AGATGGTCAAGAAAAACCAGCAACTCAATTATTTGCGAAAAATGTAACAGAC
ATTAATTTTCGATATGCCAACACGTAAGTATGACCTTAAAAAAGCAGAATCATT
ATTAGATGAAGCTGGTTGGAAGAAAGGTAAAGACAGCGATGTTTCGTCAAAAA
GATGGTAAAAACCTTGAAATGGCAATGTACTATGACAAAGGTTCTTCAAGTCA
AAAAGAACAAGCAGAATACTTACAAGCAGAATTTAAGAAAAATGGGTATTAAG
TTAAACATCAATGGCGAAACATCAGATAAAATTGCTGAACGTCGTACTTCTGG
TGATTATGACTTAATGTTCAACCAAACCTTGGGGATTATTGTACGATCCACAAA
GTACTATTGCAGCATTAAAGCGAAAAATGGTTATGAAAGTGCAACATCAGGC
ATTGAGAATAAAGATAAAAATATACAACAGCATTGATGACGCATTTAAAATCC
AAAACGGTAAAGAGCGTTCAGACGCTTATAAAAACATTTTGAAACAAGTTAA
TGATGAAGGTATCTTTATCCCTATTTACACCGGTAGTATGACAGTTGTTGCGCC
GAAAGATTTAGAAAAAGTATCATTACACAATCACAGTATGAATTACCATTCA
ATGAAATGCAGTATAAATAA

(SEQ ID NO:442)

FIG. 97

ATGAGAAACTAACTAAAATGAGTGCAATGTTACTTGCATCAGGGCTAATTT
AACTGGTTGTGGCGGTAATAAAGGTTTAGAGGAGAAAAAGAAAACAAGCAA
TTAACGTATACGACGGTTAAAGATATCGGTGATATGAATCCGCATGTTTACGG
TGGATCAATGTCTGCTGAAAGTATGATATACGAGCCGCTTGTACGTAACACGA
AAGATGGTATTAAGCCTTACTAGCTAAAAAATGGGATGTGTCTGAAGATGGG
AAGACTTATACATTCCATTAAAGAGATGATGTGAAATTCCATGATGGAACAAC
ATTTGATGCTGACGCAGTTAAGAAAAATATTGATGCGGTTCAACAAAATAAAA
AATTGCATTCTTGGTTAAAGATTTCAACATTAATTGACAATGTTAAAGTTAAA
GATAAGTACACGGTTGAATTGAATTTGAAAGAAGCATATCAACCTGCATTGGC
TGAATTAGCGATGCCTCGTCCATATGTATTTGTGTCTCCAAAAGACTTTAAAA
ACGGTACAACAAAAGATGGCGTTAAAAAGTTTCGATGGTACTGGTCCATTTAAA
TTAGGTGAACACAAAAAAGATGAGTCTGCAGACTTTAACAAAAATGATCAAT
ACTGGGGCGAAAAGTCTAAACTTAACAAAGTACAAGCAAAAGTAATGCCTGC
TGGTGAAACAGCATTCTTATCAATGAAAAAAGGTGAAACGAACTTTGCCTTCA
CAGATGATAGAGGTACGGATAGCTTAGACAAAGACTCTTTAAAACAATTGAA
AGATACAGGTGACTATCAAGTTAAGCGTAGTCAACCTATGAATACGAAAATGT
TAGTTGTCAATTCTGGTAAAAAAGATAACGCTGTCAGTGACAAAACAGTCAGA
CAAGCGATTGGTCATATGGTAAACAGAGATAAAATTGCCAAAGAAATTTTAG
ATGGTCAAGAAAAACCAGCAACTCAATTATTTGCGAAAAATGTAACAGACAT
TAATTTTCGATATGCCAACACGTAAGTATGACCTTAAAAAAGCAGAATCATTAT
TAGATGAAGCTGGTTGGAAGAAAGGTAAAGACAGTGATGTTTCGTCAAAAAGA
TGGTAAAAACCTTGAATGGCAATGTACTATGACAAAGGTTCTTCAAGTCAAA
AAGAACAAGCAGAATACTTACAAGCAGAATTTAAGAAAATGGGTATTAAGTT
AAACATCAATGGCGAAACATCAGATAAAATTGCTGAACGTCGTA CTCTGGTG
ATTATGACTTAATGTTCAACCAA ACTTGGGGATTATTGTACGATCCACAAAGT
ACTATTGCAGCATTTAAAGCGAAAAATGGTTATGAAAGTGCAACATCAGGCAT
TGAGAACAAAGATAAAATATACAACAGCATTGATGACGCATTTAAAATCCAA
AACGGTAAAGAGCGTTCAGACGCTTATAAAAACATTTTGAAACAAATTGATG
ATGAAGGTATCTTTATCCCTATTTACACGGTAGTATGACAGTTGTTGCGCCGA
AAGATTTAGAAAAAGTATCATTACACAATCACAGTATGAATTACCATTCAAT
GAAATGCAGTATAAATAA

(SEQ ID NO:443)

FIG. 98

ATGAGAAAATACTAAAATGAGTGCAATGTTACTTGCATCAGGGCTAATTTT
AACTGGTTGTGGCGGTAATAAAGGTTTAGAGGAGAAAAAGAAAACAAGCAA
TTAACGTATACGACGGTTAAAGATATCGGGGATATGAATCCGCATGTTTACGG
TGGATCGATGTCTGCTGAAAGTATGATATACGAGCCGCTTGTACGTAACACGA
AAGATGGGATTAAGCCTTTACTAGCTAAAAAATGGGATGTGTCAGAAGATGG
GAAGACATACACGTTCCATTTGAGAGATGACGTTAAATTCATGATGGTACGC
CATTTGATGCTGACGCAGTTAAGAAAAATATTGACGCAGTTCAAGAAAACAA
AAAATTGCATTCTTGGTTAAAGATTTCAACATTAATTGACAATGTTAAAGTTA
AAGATAAGTACACGGTTGAATTAATTTGAAAGAAGCATATCAACCTGCATTG
GCTGAATTAGCGATGCCTCGTCCATATGTATTTGTATCTCCAAAAGACTTTAAA
AACGGCACAACAAAAGATGGCGTTAAAAAGTTCGATGGTACTGGTCCATTTA
AATTAGGTGAACACAAAAAGATGAGTCTGCAGACTTTAATAAAAAATGATCA
ATACTGGGGCGAAAAGTCTAAACTTAACAAAGTACAAGCAAAAGTAATGCCT
GCTGGTGAAACAGCATTCTATCAATGAAAAAAGGTGAAACAAACTTTGCCTT
CACAGACGATAGAGGTACAGATAGCTTAGACAAAGACTCTTTAAAACAATTG
AAAGATACAGGTGACTATCAAGTTAAGCGTAGTCAACCTATGAATACGAAAA
TGTTAGTGGTCAATTCTGGTAAAAAAGATAACGCTGTTCAGTGACAAAACAGTC
AGACAAGCGATTGGTCATATGGTAAACAGAGATAAAATTGCCAAAGAAATTT
TAGATGGTCAAGAAAAACCAGCAACTCAATTATTGCGAAAAATGTAACAGA
CATTAAATTCGATATGCCAACACGTAAGTATGACCTTAAAAAAGCAGAATCAT
TATTAGATGAAGCTGGTTGGAAGAAAGGTAAAGACAGCGATGTTTCGTCAAAA
AGATGGTAAAAACCTTGAAATGGCAATGTACTATGACAAAGGTTCTTCAAGTC
AAAAAGAACAAGCAGAATACTTACAAGCAGAATTTAAGAAAATGGGTATTAA
GTTAAACATCAATGGCGAAACATCAGATAAAATTGCTGAACGTCGTACTTCTG
GTGATTATGACTTAATGTTCAACCAAACCTTGGGGATTATTGTACGATCCACAA
AGTACTATTGCAGCATTAAAGCGAAAAATGGTTATGAAAGTGCAACATCAG
GCATTGAGAACAAGATAAAATATACAACAGCATTGATGACGCATTTAAAAT
CCAAAACGGTAAAGAGCGTTCAGACGCTTATAAAAAACATTTTGAAACAAATT
GATGATGAAGGTATTTTTATCCCTATTTACACGGTAGTATGACAGTTGTTGCG
CCGAAAGATTTAGAAAAAGTAGCATTACACAATCACAGTATGAATTACCATT
CAATGAAATGCAGTATAAATAA

(SEQ ID NO:444)

FIG. 99

ATGAGAAACTAACTAAAATGAGTGCAATGTTACTTGCATCAGGGCTAATTTT
AACTGGTTGTGGCGGTAATAAAGGTTTAGAGGAGAAAAAGAAAACAAGCAA
TTAACGTATACGACGGTTAAAGATATCGGTGATATGAATCCGCATGTTTACGG
TGGATCGATGTCTGCTGAAAGTATGATATACGAGCCGCTTGTACGTAACACGA
AAGATGGAATTAAGCCTTTACTAGCTAAAAAATGGGATGTGCTGAAGATGG
GAAGACATATACATTCCATTTGAGAGATGACGTTAAATCCATGATGGTACAC
CATTGATGCTGACGCAGTTAAGAAAAATATTGATGCGGTTCAACAAAATAAA
AAATTGCATTCTTGGTTAAAGATTTCAACATTAATTGACAATGTTAAAGTTAA
AGATAAGTACACGGTTGAATTGAATTGAAAGAAGCATATCAACCTGCATTGG
CTGAATTAGCGATGCCTCGTCCATATGTATTTGTGCTCCAAAAGACTTTAAAA
ACGGTACAACAAAAGATGGCGTTAAAAAGTTTCGATGGTACTGGTCCATTTAAA
TTAGGTGAACATAAAAAAGATGAGTCTGCAGACTTTAACAAAAATGATCAAT
ACTGGGGCGAAAAGTCTAAACTTAACAAAGTACAAGCAAAAGTAATGCCTGC
TGGTGAAACAGCATTCCATCAATGAAAAAAGGTGAAACGAACTTGCCTTCA
CAGATGATAGAGGTACGGATAGCTTAGACAAAGACTCTTTAAAACAATTGAA
AGATACAGGTGACTATCAAGTTAAGCGTAGTCAACCTATGAATACGAAAATGT
TAGTTGTCAATTCTGGTAAAAAAGATAACGCTGTGAGTGACAAAACAGTCAG
ACAAGCGATTGGTCATATGGTAAACAGAGATAAAATTGCCAAAGAAATTTTA
GATGGTCAAGAAAACCAGCAACTCAATTATTTGCGAAAAATGTAACAGATA
TTAATTTGATATGCCAACACGTAAGTATGACCTTAAAAAAGCAGAATCATT
TTAGATGAAGCTGGTTGGAAGAAAGGTAAAGACAGCGATGTTTCGTCAAAAAG
ATGGTAAAAACCTTGAAATGGCAATGTACTATGACAAAGGTTCTTCAAGTCAA
AAAGAACAAGCAGAATACTTACAAGCAGAATTTAAGAAAATGGGTATTAAGT
TAAACATCAATGGCGAAACATCAGATAAAATTGCTGAACGTCGTACTTCTGGT
GATTATGACTTAATGTTCAACCAAACCTTGGGGATTATTGTACGATCCACAAAG
TACTATTGCAGCATTAAAGCGAAAAATGGTTATGAAAGTGCAACATCAGGCA
TTGAGAACAAGATAAAATATACAACAGCATTGATGACGCATTTAAAATCCA
AAACGGTAAAGAGCGTTCAGGCGTTATAAAAACATTTTGAAACAAATTGAT
GATGAAGGTATCTTTATCCCTATTTACACGGTAGTATGACAGTTGTTGCGCCG
AAAGATTTAGAAAAAGTATCATTACACAATCACAGTATGAATTACCATTCAA
TGAAATGCAGTATAAATAA

(SEQ ID NO:445)

FIG. 100

ATGAGAAAACACTAACTAAAATGAGTGCAATGTTACTTGCATCAGGGCTAATTTT
AACTGGTTGTGGCGGTAATAAAGGTTTAGAGGAGAAAAAAGAAAACAAGCAA
TTAACGTATACGACGGTTAAAGATATCGGTGATATGAATCCGCATGTTTACGG
TGGATCAATGTCTGCTGAAAGTATGATATACGAGCCGCTTGTACGTAACACGA
AAGATGGTATTAAGCCTTTACTAGCTAAAAAGTGGGATGTGTCTGAAGATGGG
AAGACATACACGTTCCATTTGAGAGATGACGTTAAATTCCATGATGGTACGCC
ATTTGATGCTGACGCAGTTAAGAAAAATATTGACGCAGTTCAAGAAAACAAA
AAATTGCATTCTTGGTTAAAGATTTTCGACATTAATTGACAATGTTAAAGTTAA
AGATAAGTACACGGTTGAATTGAATTTGAAAGAAGCATATCAACCTGCATTGG
CTGAATTAGCGATGCCTCGTCCATATGTATTTGIGTCTCCAAAAGACTTTAAAA
ACGGTACAACAAAAGATGGCGTTAAAAAGTTTCGATGGTACTGGTCCATTTAAA
TTAGGTGAACACAAAAAGATGAGTCTGCAGACTTTAACAAAAATGATCAAT
ACTGGGGCGAAAAGTCTAACTTAACAAAGTACAAGCAAAAGTAATGCCTGC
TGGTGAAACAGCATTCCCTATCAATGAAAAAAGGTGAAACGAACTTTGCCTTCA
CAGATGATAGAGGTACAGATAGCTTAGACAAAGACTCTTTAAAACAATTGAA
AGATACAGGTGACTATCAAGTTAAGCGTAGTCAACCTATGAATACGAAAATGT
TAGTTGTCAATTCTGGTAAAAAAGATAACGCTGTGAGTGACAAAACAGTCAG
ACAAGCGATTGGTCATATGGTAAACAGAGATAAAATTGCCAAAGAAATTTIA
GATGGTCAAGAAAACCAGCAACTCAATTATTTGCGAAAAATGTAACAGACA
TTAATTTGATATGCCAACACGTAAGTATGACCTTAAAAAAGCAGAATCATT
TTAGATGAAGCTGGTTGGAAGAAAGGTAAAGACAGCGATGTTTCGTCAAAAAG
ATGGTAAAAACCTTGAAATGGCAATGTACTATGACAAAGGTTCTTCAAGTCAA
AAAGAACAAGCAGAATACTTACAAGCAGAATTTAAGAAAATGGGTATTAAGT
TAAACATCAATGGCGAAACATCAGATAAAATTGCTGAACGTCGTACTTCTGGT
GATTATGACTTAATGTTCAACCAAACCTTGGGGATTATTGTACGATCCACAAAG
TACTATTGCAGCATTAAAGCGAAAAATGGTTATGAAAGTGCAACATCAGGCA
TTGAGAACAAGATAAAATATACAACAGCATTGATGACGCATTTAAAATCCA
AAACGGTAAAGAGCGTTCAGACGCTTATAAAAACATTTTGAAACAAATTGAT
GATGAAGGTATCTTTATCCCTATTTACACGGTAGTATGACAGTTGTTGCACCA
AAAGATTTAGAAAAAGTATCATTACACAATCACAGTATGAATTACCATTCAA
TGAAATGCAGTATAAATAA

(SEQ ID NO:446)

FIG. 101

ATGAGAAACTAACTAAAATGAGTGCAATGTTACTTGCATCAGGGCTAATTTT
AACTGGTTGTGGCGGTAATAAAGGTTTAGAGGAGAAAAAGAAAACAAGCAA
TTAACGTATACGACGGTTAAAGATATCGGTGATATGAATCCGCATGTTTACGG
TGGATCAATGTCTGCTGAAAGTATGATATACGAGCCGCTTGTACGTAACACGA
AAGATGGTATTAAGCCTTACTAGCTAAAAAATGGGATGTGTCTGAAGATGGG
AAGACTTATACATTCCATTTAAGAGATGATGTGAAATTCCATGATGGAACAAC
ATTTGATGCTGACGCAGTTAAGAAAAATATTGATGCGGTTCAACAAAATAAAA
AATTGCATTCTTGGTTAAAGATTCAACATTAATTGACAATGTTAAAGTTAAA
GATAAGTACACGGTTGAATTGAATTTGAAAGAAGCATATCAACCTGCATTGGC
TGAATTAGCGATGCCTCGTCCATATGTATTTGTGTCTCCAAAAGACTTTAAAA
ACGGTACAACAAAAGATGGCGTTAAAAAGTTTCGATGGTACTGGTCCATTTAAA
TTAGGTGAACACAAAAAAGATGAGTCTGCAGACTTTAACAAAAATGATCAAT
ACTGGGGCGAAAAGTCTAACTTAACAAAGTACAAGCAAAAAGTAATGCCTGC
TGGTGAAACAGCATTCCATCAATGAAAAAAGGTGAAACGAACTTGCCTTCA
CAGATGATAGAGGTACGGATAGCTTAGACAAAGACTCTTTAAAACAATTGAA
AGATACAGGTGACTATCAAGTTAAGCGTAGTCAACCTATGAATACGAAAATGT
TAGTTGTCAATTCTGGTAAAAAAGATAACGCTGTCAAGTACAAAACAGTCAGA
CAAGCGATTGGTCATATGGTAAACAGAGATAAAAATTGCCAAAGAAAATTTAG
ATGGTCAAGAAAACCAGCAACTCAATTATTTGCGAAAAATGTAACAGACAT
TAATTTTCGATATGCCAACACGTAAGTATGACCTTAAAAAAGCAGAATCATTAT
TAGATGAAGCTGGTTGGAAGAAAGGTAAAGACAGTGATGTTTCGTCAAAAAGA
TGGTAAAAACCTTGAATGGCAATGTACTATGACAAAGGTTCTTCAAGTCAAA
AAGAACAAGCAGAATACTTACAAGCAGAATTTAAGAAAATGGGTATTAAGTT
AAACATCAATGGCGAAACATCAGATAAAAATTGCTGAACGTCGTACTIONCTGGTG
ATTATGACTTAATGTTCAACCAAACCTGGGGATTATTGTACGATCCACAAAGT
ACTATTGCAGCATTAAAGCGAAAAATGGTTATGAAAGTGCAACATCAGGCAT
TGAGAACAAAGATAAAAATATACAACAGCATTGATGACGCATTTAAAATCCAA
AACGGTAAAGAGCGTTCAGACGCTTATAAAAACATTTTGAAACAAATTGATG
ATGAAGGTATCTTTATCCCTATTTACACGGTAGTATGACAGTTGTTGCGCCGA
AAGATTTAGAAAAGTATCATTACACAATCACAGTATGAATTACCATTCAAT
GAAATGCAGTATAAATAA

(SEQ ID NO:447)

FIG. 102

ATGAGAAAACCTAACTAAAATGAGTGCAATGTTACTTGCATCAGGGCTAATTTT
AACTGGTTGTGGCGGTAATAAAGGTTTAGAGGAGAAAAAAGAAAACAAGCAA
TTAACGTATACGACGGTTAAAGATATCGGTGATATGAATCCGCATGTTTACGG
TGGATCAATGTCTGCTGAAAGTATGATATACGAGCCGCTTGTACGTAACACGA
AAGATGGTATTAAGCCTTTACTAGCTAAAAAGTGGGATGTGTCTGAAGATGGG
AAGACATACACGTTCCATTTGAGAGATGACGTTAAATTCCATGATGGTACGCC
ATTTGATGCTGACGCAGTTAAGAAAAATATTGACGCAGTTCAAGAAAACAAA
AAATTGCATTCTTGGTTAAAGATTTTCGACATTAATTGACAATGTTAAAGTTAA
AGATAAGTACACGGTTGAATTGAATTTGAAAGAAGCATATCAACCTGCATTGG
CTGAATTAGCGATGCCTCGTCCATATGTATTTGTGTCTCCAAAAGACTTTAAAA
ACGGTACAACAAAAGATGGCGTTAAAAAGTTTCGATGGTACTGGTCCATTTAAA
TTAGGTGAACACAAAAAAGATGAGTCTGCAGACTTTAACAAAAATGATCAAT
ACTGGGGCGAAAAGTCTAAACTTAACAAAAGTACAAGCAAAAAGTAATGCCTGC
TGGTGAAACAGCATTCCATCAATGAAAAAAGGTGAAACGAACTTTGCCTTCA
CAGATGATAGAGGTACAGATAGCTTAGACAAAAGACTCTTTAAAACAATTGAA
AGATACAGGTGACTATCAAGTTAAGCGTAGTCAACCTATGAATACGAAAATGT
TAGTTGTCAATTCTGGTAAAAAAGATAACGCTGTGAGTGACAAAACAGTCAG
ACAAGCGATTGGTCATATGGTAAACAGAGATAAAATTGCCAAAGAAATTTTA
GATGGTCAAGAAAACCAGCAACTCAATTATTTGCGAAAAATGTAACAGACA
TTAATTTGATATGCCAACACGTAAGTATGACCTTAAAAAAGCAGAATCATT
TTAGATGAAGCTGGTTGGAAGAAAGGTAAAGACAGCGATGTTTCGTCAAAAAG
ATGGTAAAAACCTTGAAATGGCAATGTACTATGACAAAAGGTTCTTCAAGTCAA
AAAGAACAAGCAGAATACTTACAAGCAGAATTTAAGAAAATGGGTATTAAGT
TAAACATCAATGGCGAAACATCAGATAAAATTGCTGAACGTCGTACTTCTGGT
GATTATGACTTAATGTTCAACCAAACCTGGGGATTATTGTACGATCCACAAAG
TACTATTGCAGCATTAAAGCGAAAAATGGTTATGAAAGTGCAACATCAGGCA
TTGAGAACAAAGATAAAATATACAACAGCATTGATGACGCATTTAAAATCCA
AAACGGTAAAGAGCGTTCAGACGCTTATAAAAACATTTTGAAACAAATTGAT
GATGAAGGTATCTTTATCCCTATTTACACGGTAGTATGACAGTTGTTGCACCA
AAAGATTTAGAAAAAGTATCATTCACACAATCACAGTATGAATTACCATTCAA
TGAAATGCAGTATAAATAA

(SEQ ID NO:448)

FIG. 103

ATGAGAAAACCTAACTAAAATGAGTGCAATGTTACTTACATCAGGGCTAATTTT
AACTGGTTGTGGCGGTAATAAAGGTTTAGAGGAGAAAAAAGAAAACAAGCAA
TTAACGTATACGACGGTTAAAGATATCGGTGATATGAATCCGCATGTTTACGG
TGGATCAATGTCTGCTGAAAGTATGATATACGAGCCGCTTGTACGTAACACGA
AAGATGGTATTAAGCCTTTACTAGCTAAAAAGTGGGATGTGTCTGAAGATGGG
AAGACATACACGTTCCATTTGAGAGATGACGTTAAATTCCATGATGGTACGCC
ATTTGATGCTGACGCAGTTAAGAAAAATATTGACGCAGTTCAAGAAAACAAA
AAATTGCATTCTTGGTTAAAGATTTTCGACATTAATTGACAATGTTAAAGTTAA
AGATAAGTACACGGTTGAATTGAATTTGAAAGAAGCATATCAACCTGCATTGG
CTGAATTAGCGATGCCTCGTCCATATGTATTTGTGTCTCCAAAAGACTTTAAAA
ACGGTACAACAAAAGATGGCGTTAAAAAGTTTCGATGGTACTGGTCCATTTAAA
TTAGGTGAACACAAAAAAGATGAGTCTGCAGACTTTAACAAAAATGATCAAT
ACTGGGGCGAAAAGTCTAAACTTAACAAAAGTACAAGCAAAAAGTAATGCCTGC
TGGTGAAACAGCATTCCCTATCAATGAAAAAAGGTGAAACGAACTTTGCCTTCA
CAGATGATAGAGGTACAGATAGCTTAGACAAAAGACTCTTTAAAAACAATTGAA
AGATACAGGTGACTATCAAGTTAAGCGTAGTCAACCTATGAATACGAAAATGT
TAGTTGTCAATTCTGGTAAAAAAGATAACGCTGTGAGTGACAAAACAGTCAG
ACAAGCGATTGGTCATATGGTAAACAGAGATAAAATTGCCAAAGAAATTTTA
GATGGTCAAGAAAACCAGCAACTCAATTATTTGCGAAAAATGTAACAGACA
TTAATTTTCGATATGCCAACACGTAAGTATGACCTTAAAAAAGCAGAATCATT
TTAGATGAAGCTGGTTGGAAGAAAGGTAAAGACAGCGATGTTTCGTCAAAAAG
ATGGTAAAAACCTTGAAATGGCAATGTACTATGACAAAAGGTTCTTCAAGTCAA
AAAGAACAAGCAGAATACTTACAAGCAGAATTTAAGAAAATGGGTATTAAGT
TAAACATCAATGGCGAAACATCAGATAAAATTGCTGAACGTCGTACTTCTGGT
GATTATGACTTAATGTTCAACCAAACCTGGGGATTATTGTACGATCCACAAAG
TACTATTGCAGCATTTAAAGCGAAAAATGGTTATGAAAGTGCAACATCAGGCA
TTGAGAACAAAGATAAAATATACAACAGCATTGATGACGCATTTAAAATCCA
AAACGGTAAAGAGCGTTCAGACGCTTATAAAAACATTTTGAACAAAATTGAT
GATGAAGGTATCTTTATCCCTATTTACACGGTAGTATGACAGTTGTTGCACCA
AAAGATTTAGAAAAAGTATCATTACACAATCACAGTATGAATTACCATTCAA
TGAAATGCAGTATAAATAA

(SEQ ID NO:449)

FIG. 104

ATGAGAAAACACTAACTAAAATGAGTGCAATGTTACTTGCATCAGGGCTAATTTT
AACTGGTTGTGGCGGTAATAAAGGTTTAGAGGAGAAAAAGAAAACAAGCAA
TTAACGTATACGACGGTTAAAGATATCGGTGATATGAATCCGCATGTTTACGG
TGGATCAATGTCTGCTGAAAGTATGATATACGAGCCGCTTGTACGTAACACGA
AAGATGGTATTAAGCCTTTACTAGCTAAAAAGTGGGATGTGTCTGAAGATGGG
AAGACATACACGTTCCATTTGAGAGATGACGTTAAATTCCATGATGGTACGCC
ATTTGATGCTGACGCAGTTAAGAAAAATATTGACGCAGTTCAAGAAAACAAA
AAATTGCATTCTTGGTTAAAGATTTTCGACATTAATTGACAATGTTAAAGTTAA
AGATAAGTACACGGTTGAATTGAATTTGAAAGAAGCATATCAACCTGCATTGG
CTGAATTAGCGATGCCCTCGTCCATATGTATTTGTGTCTCCAAAAGACTTTAAAA
ACGGTACAACAAAAGATGGCGTTAAAAAGTTTCGATGGTACTGGTCCATTTAAA
TTAGGTGAACACAAAAAGATGAGTCTGCAGACTTTAACAAAAATGATCAAT
ACTGGGGCGAAAAGTCTAACTTAACAAAGTACAAGCAAAAAGTAATGCCTGC
TGGTGAAACAGCATTCCCTATCAATGAAAAAAGGTGAAACGAACTTTGCCTTCA
CAGATGATAGAGGTACAGATAGCTTAGACAAAGACTCTTTAAAACAATTGAA
AGATACAGGTGACTATCAAGTTAAGCGTAGTCAACCTATGAATACGAAAATGT
TAGTTGTCAATTCTGGTAAAAAAGATAACGCTGTGAGTGACAAAACAGTCAG
ACAAGCGATTGGTCATATGGTAAACAGAGATAAAATTGCCAAAGAAATTTTA
GATGGTCAAGAAAAACCAGCAACTCAATTATTTGCGAAAAATGTAACAGACA
TTAATTTGATATGCCAACACGTAAGTATGACCTTAAAAAAGCAGAATCATT
TTAGATGAAGCTGGTTGGAAGAAAGGTAAAGACAGCGATGTTTCGTCAAAAAG
ATGGTAAAAACCTTGAAATGGCAATGTACTATGACAAAGGTTCTTCAAGTCAA
AAAGAACAAGCAGAATACTTACAAGCAGAATTTAAGAAAATGGGTATTAAGT
TAAACATCAATGGCGAAACATCAGATAAAATTGCTGAACGTCGTACTTCTGGT
GATTATGACTTAATGTTCAACCAAACTTGGGGATTATTGTACGATCCACAAAG
TACTATTGCAGCATTTAAAGAGAAAAATGGTTATGAAAGTGCAACATCAGGC
ATTGAGAACAAAGATAAAATATACAACAGCATTGATGACGCATTTAAAATCC
AAAACGGTAAAGAGCGTTCAGACGCTTATAAAAAACATTTTGAAACAAATTGA
TGATGAAGGTATCTTTATCCCTATTTACACCGGTAGTATGACAGTTGTTGCACC
AAAAGATTTAGAAAAAGTATCATTACACAATCACAGTATGAATTACCATTCA
ATGAAATGCAGTATAAATAA

(SEQ ID NO:450)

FIG. 105

ATGAGAAAACACTAAAATGAGTGCAATGTTACTTGCATCAGGGCTAATTTT
AACTGGTTGTGGCGGTAATAAAGGTTTAGAGGAGAAAAAAGAAAACAAGCAA
TTAACGTATACGACGGTTAAAGATATCGGTGATATGAATCCGCATGTTTACGG
TGGATCGATGTCTGCTGAAAGTATGATATACGAGCCGCTTGTACGTAACACGA
AAGATGGAATTAAGCCTTTACTAGCTAAAAAATGGGATGTGTCTGAAGATGG
GAAGACATATACATTCCATTTGAGAGATGACGTTAAATTCATGATGGTACAC
CATTGATGCTGACGCAGTTAAGAAAAATATTGATGCGGTTCAACAAAATAAA
AAATTGCATTCTTGGTTAAAGATTTCAACATTAATTGACAATGTTAAAGTTAA
AGATAAGTACACGGTTGAATTGAATTTGAAAGAAGCATATCAACCTGCATTGG
CTGAATTAGCGATGCCTCGTCCATATGTATTTGTGICTCCAAAAGACTTTAAAA
ACGGTACAACAAAAGATGGCGTTAAAAAGTTTCGATGGTACTGGTCCATTTAAA
TTAGGTGAAACATAAAAAAGATGAGTCTGCAGACTTTAACAAAAATGATCAAT
ACTGGGGCGAAAAGTCTAAACTTAACAAAGTACAAGCAAAAAGTAATGCCTGC
TGGTGAAACAGCATTCCATCAATGAAAAAAGGTGAAACGAACTTTGCCTTCA
CAGATGATAGAGGTACGGATAGCTTAGACAAAGACTCTTTAAAACAATTGAA
AGATACAGGTGACTATCAAGTTAAGCGTAGTCAACCTATGAATACGAAAATGT
TAGTTGTCAATTCTGGTAAAAAAGATAACGCTGTGAGTGACAAAACAGTCAG
ACAAGCGATTGGTCATATGGTAAACAGAGATAAAATTGCCAAAGAAATTTTA
GATGGTCAAGAAAAACCAGCAACTCAATTATTTGCGAAAAATGTAACAGATA
TTAATTTGATATGCCAACACGTAAGTATGACCTTAAAAAAGCAGAATCATT
TTAGATGAAGCTGGTTGGAAGAAAGGTAAAGACAGCGATGTTTCGTCAAAAAG
ATGGTAAAAACCTTGAAATGGCAATGTACTATGACAAAAGGTTCTTCAAGTCAA
AAAGAACAAGCAGAATACTTACAAGCAGAATTTAAGAAAATGGGTATTAAGT
TAAACATCAATGGCGAAACATCAGATAAAATTGCTGAACGTCGTACTTCTGGT
GATTATGACTTAATGTTCAACCAAACCTTGGGGATTATTGTACGATCCACAAAG
TACTATTGCAGCATTAAAGCGAAAAATGGTTATGAAAGTGCAACATCAGGCA
TTGAGAACAAAGATAAAATATACAACAGCATTGATGACGCATTTAAAATCCA
AAACGGTAAAGAGCGTTCAGGCGCTTATAAAAACATTTTGAACAAATTGAT
GATGAAGGTATCTTTATCCCTATTTACACGGTAGTATGACAGTTGTTGCGCCG
AAAGATTTAGAAAAAGTATCATTACACAATCACAGTATGAATTACCATTCAA
TGAAATGCAGTATAAATAA

(SEQ ID NO:451)

FIG. 106

TCATCTGATAGCAAAGATAAGGAAACAACCTTCAATTAACATGCAATGGGTA
CAACTGAAATTAAGGGAAACCAAAGCGTGTTGTTACGCTATATCAAGGTGCC
ACTGACGTCGCTGTATCTTTAGGTGTTAAACCTGTAGGTGCTGTAGAATCATG
GACACAAAACCGAAATTCGAATACATAAAAAATGATTTAAAAGATACTAAG
ATTGTAGGTCAAGAACCTGCACCTAACTTAGAGGAAATCTCTAAATTAACC
GGACTTAAATTGTCGCGTCAAAAGTTAGAAATGAAAAAGTTTACGATCAATTAT
CTAAAATCGCACCAACAGTTTCTACTGATACAGTTTTCAAATTCAAAGATACA
ACTAAGTTAATGGGGAAAGCTTTAGGGAAAGAAAAAGAAGCTGAAGATTTAC
TTAAAAGTACGATGATAAAGTAGCTGCATTCCAAAAGATGCAAAAGCAAA
GTATAAAGATGCATGGCCATTGAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCCGTGCTGATC
ATACAAGAATTTATGCTGGTGGATATGCTGGTGAAATCTTAAATGATTTAGGA
TTCAAACGTAATAAAGACTTACAAAACAAGTTGATAATGGTAAAGATATTAT
CCAACTTACATCTAAAGAAAGTATTCCATTAATGAACGCTGATCATATTTTTGT
AGTAAAATCAGATCCAAATGCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAGACTGAA
AGCGAATGGACTTCAAGTAAAGAGTGGAAAAATTTAGACGCAGTTAAAACA
ACCAAGTATCTGATGATTTAGATGAAATCACTTGGAACTTAGCTGGCGGATAT
AAATCATCATTAAAACCTTATTGACGATTTATATGAAAAGTTAAATATTGAAAA
ACAATCAAATAA

(SEQ ID NO:452)

FIG. 107

ATGAATAAAGTAATTAATAATGCTTGTGTTACGCTTGCTTTCCTACTTGTTTTA
GCAGGATGTAGTGGGAATTCAAATAACAATCATCTGATAACAAAGATAAGG
AAACAACCTCAATTAACATGCAATGGGTACAACCTGAAATTAAGGGAAACC
AAAGCGTGTTGTTACGCTATATCAAGGTGCCACTGACGTCGCTGTATCTTTAG
GTGTTAAACCTGTAGGTGCTGTAGAATCATGGACACAAAACCGAAATTCGA
ATACATAAAAAATGATTTAAAAGATACTAAGATTGTAGGTCAAGAACCTGCG
CCTAACTTAGAGGAAATCTCTAAATTAACCAGGACTTAATTGTCGCGTCAAA
AGTTAGAAATGAAAAAGTTTACGATCAATTATCTAAAATCGCACCAACAGTTT
CTACTGATACAGTTTTCAAATTCAAAGATACAACCTAAGTTAATGGGGAAAGCT
TTAGGGAAAGAAAAAGAAGCTGAAGATTTACTTAAAAGTACGATGATAAAG
TAGCTGCATTCCAAAAGATGCAAAAGCAAAGTATAAAGATGCATGGCCATT
GAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCCGTGCTGATCATAACAAGAATTTATGCTGGTG

56/112

GATATGCTGGTGAAATCTTAAATGATTTAGGATTCAAACGTAATAAAGACTTA
CAAAAACAAGTTGATAATGGTAAAGATATTATCCAACCTACATCTAAAGAAA
GCATTCCATTAATGAACGCTGATCATATTTTTGTAGTAAAATCAGATCCAAAT
GCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAAGACTGAAAGCGAATGGACTTCAAGTA
AAGAGTGGAAAAATTTAGACGCAGTTAAAAACAACCAAGTATCTGATGATTT
AGATGAAATCACTTGGAACCTAGCTGGCGGATATAAATCATCATTAAACTTA
TTGACGATTTATATGAAAAGTTAAATATTGAAAAACAATCAAAATAA
(SEQ ID NO:453)

FIG. 108

ATGAATAAAGTAATTAATAATGCTTGTTGTTACGCTTGCTTTCCTACTTGTTTTA
GCAGGATGTAGTGGGAATTCAAATAACAATCATCTGATAACAAAGATAAGG
AAACAACCTCAATTAACATGCAATGGGTACAACCTGAAATTAAGGGAAACC
AAAGCGTGTGTTACGCTATATCAAGGTGCCACTGACGTCGCTGTATCTTTAG
GTGTTAAACCTGTAGGTGCTGTAGAATCATGGACACAAAAACCGAAATTCGA
ATACATAAAAAATGATTTAAAAGATACTAAGATTGTAGGTCAAGAACCTGCA
CCTAACTTAGAGGAAATCTCTAAATTAACCGGACTTAATTGTCGCGTCAAA
AGTTAGAAATGAAAAAGTTTACGATCAATTATCTAAAATCGCACCAACAGTTT
CTACTGATACAGTTTTCAAATCAAAGATACAACCTAAGTTAATGGGGAAAGCT
TTAGGGAAAGAAAAAGAAGCTGAAGATTTACTTAAAAAGTACGATGATAAAG
TAGCTGCATTCCAAAAAGATGCAAAAAGCAAAGTATAAAGATGCATGGCCATT
GAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCCGTGCTGATCATAACAAGAATTTATGCTGGTG
GATATGCTGGTGAAATCTTAAATGATTTAGGATTCAAACGTAATAAAGACTTA
CAAAAACAAGTTGATAATGGTAAAGATATTATCCAACCTACATCTAAAGAAA
GCATTCCATTAATGAACGCTGATCATATTTTTGTAGTAAAATCAGATCCAAAT
GCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAAGACTGAAAGCGAATGGACTTCAAGTA
AAGAGTGGAAAAATTTAGACGCAGTTAAAAACAACCAAGTATCTGATGATTT
AGATGAAATCACTTGGAACCTAGCTGGCGGATATAAATCTTCATTAAACTTA
TTGACGATTTATATGAAAAGTTAAATATTGAAAAACAATCAAAATAA
(SEQ ID NO:454)

FIG. 109

ATGAATAAAGTAATTAATAATGCTTGTTGTTACGCTTGCTTTCCTACTTGTTTTA
GCAGGATGTAGTGGGAATTCAAATAAGCAATCATCTGATAGCAAAGATAAGG

57/112

AAACAACCTCAATTAACATGCAATGGGTACAACCTGAAATTAAGGGAAACC
AAAGCGGTTGTTACACTATATCAAGGTGCCACTGACGTCGCTGTATCTTTAG
GTGTTAAACCTGTAGGTGCTGTAGAATCATGGACACAAAAACCGAAATTCGA
ATACATAAAAAATGATTTAAAAGATACTAAGATTGTAGGTCAAGAACCTGCA
CCTAACTTAGAAGAAATCTCTAAATTAACCAGGACTTAATTGTCGCGTCAAA
AGTTAGAAATGAAAAAGTTTACGATCAATTATCTAAAATCGCACCAACAGTTT
CTACTGATACAGTTTTCAAATTCAAAGATACTAAGTTAATGGGGAAAGCT
TTAGGGAAAGAAAAAGAAGCTGAAGATTTACTTAAAAAGTACGATGATAAAG
TAGCTGCATTCCAAAAAGATGCAAAGCAAAGTATAAAGATGCATGGCCATT
GAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCCGTGCTGATCATAACAAGAATTTATGCTGGTG
GATATGCTGGTGAAATCTTAAATGATTTAGGATTCAAACGTAATAAAGACTTA
CAAAAACAAGTTGATAATGGTAAAGATATTATCCAACCTTACATCTAAAGAAA
GCATTCCATTAATGAACGCTGATCATATTTTTGTAGTAAAATCAGATCCAAAT
GCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAAGACTGAAAGCGAATGGACTTCAAGTA
AAGAGTGGAAAAATTTAGACGCAGTTAAAAACAACCAAGTATCTGATGATTT
AGATGAAATCACTTGGAACTTAGCTGGCGGATATAAATCATCATTAAACTTA
TTGACGATTTATATGAAAAGTTAAATATTGAAAAACAATCAAATAA
(SEQ ID NO:455)

FIG. 110

ATGAATAAAGTAATTAATAATGCTTGTGTTACGCTTGCTTTCCTACTTGTTTTA
GCAGGATGTAGTGGGAATTCAAATAACAATCATCTGATAACAAAGATAAGG
AAACAACCTCAATTAACATGCAATGGGTACAACCTGAAATTAAGGGAAACC
AAAGCGTGTGTTACGCTATATCAAGGTGCCACTGACGTCGCTGTATCTTTAG
GTGTTAAACCTGTAGGTGCTGTAGAATCATGGACACAAAAACCGAAATTCGA
ATACATAAAAAATGATTTAAAAGATACTAAGATTGTAGGTCAAGAACCTGCA
CCTAACTTAGAGGAAATCTCTAAATTAACCAGGACTTAATTGTCGCGTCAAA
AGTTAGAAATGAAAAAGTTTACGATCAATTATCTAAAATCGCACCAACAGTTT
CTACTGATACAGTTTTCAAATTCAAAGATACTAAGTTAATGGGGAAAGCT
TTAGGGAAAGAAAAAGAAGCTGAAGATTTACTTAAAAAGTACGATGATAAAG
TAGCTGCATTCCAAAAAGATGCAAAGCAAAGTATAAAGATGCATGGCCATT
GAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCCGTGCTGATCATAACAAGAATTTATGCTGGTG
GATATGCTGGTGAAATCTTAAATGATTTAGGATTCAAACGTAATAAAGACTTA
CAAAAACAAGTTGATAATGGTAAAGATATTATCCAACCTTACATCCAAAGAAA

GCATTCCATTAATGAACGCTGATCATATTTTTGTAGTAAAATCAGATCCAAAT
GCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAAGACTGAAAGCGAATGGACTTCAAGTA
AAGAATGGAAAAATTTAGACGCAGTTAAAAACAACCAAGTATCTGATGATTT
AGATGAAATCACTTGGAAGTTAGCTGGCGGATATAAATCATCATTAAAAATTGA
TTGACGATTTATATGAAAAGTTAAATATTGAAAAACAATCAAATAA
(SEQ ID NO:456)

FIG. 111

ATGAATAAAGTAATTAATAATGCTTGTTGTTACGCTTGCTTTCCTACTTGTTTTA
GCAGGATGTAGTGGGAATTCAAATAACAATCATCTGATAACAAAGATAAGG
AAACAACCTCAATTAACATGCAATGGGTACAACCTGAAATTAAGGGAAACC
AAAGCGTGTTGTTACGCTATATCAAGGTGCCACTGACGTCGCTGTATCTTTAG
GTGTTAAACCTGTAGGTGCTGTAGAATCATGGACACAAAAACCGAAATTCGA
ATACATAAAAAATGATTTAAAAGATACTAAGATTGTAGGTCAAGAACCTGCA
CCTAACTTAGAGGAAATCTCTAAATTAACCGGACTTAATTGTCGCGTCAAAA
AGTTAGAAATGAAAAGTTTACGATCAATTATCTAAAATCGCACCAACAGTTT
CTACTGATACAGTTTTCAAATTCAAAGATACAACCTAAGTTAATGGGGAAAGCT
TTAGGGAAAGAAAAAGAAGCTGAAGATTTACTTAAAAAGTACGATGATAAAG
TAGCTGCATTCCAAAAAGATGCAAAAAGCAAAGTATAAAGATGCATGGCCATT
GAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCCGTGCTGATCATAACAAGAATTTATGCTGGTG
GATATGCTGGTGAAATCTTAAATGATTTAGGATTCAAACGTAATAAAGACTTA
CAAAAACAAGTTGATAATGGTAAAGATATTATCCAACCTACATCTAAAGAAA
GCATTCCATTAATGAACGCTGATCATATTTTTGTAGTAAAATCAGATCCAAAT
GCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAAGACTGAAAGCGAATGGACTTCAAGTA
AAGAGTGGAAAAATTTAGACGCAGTTAAAAACAACCAAGTATCTGATGATTT
AGATGAAATCACTTGGAAGTTAGCTGGCGGATATAAATCTTCATTAAACCTA
TTGACGATTTATATGAAAAGTTAAATATTGAAAAACAATCAAATAA
(SEQ ID NO:457)

FIG. 112

ATGAATAAAGTAATTAATAATGCTTGTTGTTACGCTTGCTTTCCTACTTGTTTTA
GCAGGATGTAGTGGGAATTCAAATAACAATCATCTGATAACAAAGATAAGG
AAACAACCTCAATTAACATGCAATGGGTACAACCTGAAATTAAGGGAAACC
AAAGCGTGTTGTTACGCTATATCAAGGTGCCACTGACGTCGCTGTATCTTTAG

59/112

GTGTTAAACCTGTAGGTGCTGTAGAATCATGGACACAAAAACCGAAATTCGA
ATACATAAAAAATGATTTAAAAGATACTAAGATTGTAGGTCAAGAACCTGCA
CCTAACTTAGAGGAAATCTCTAAATTA AACCGGACTTAATTGTCGCGTCAAA
AGTTAGAAATGAAAAAGTTTACGATCAATTATCTAAAATCGCACCAACAGTTT
CTACTGATACAGTTTTCAAATTC AAAGATACTAACTAAGTTAATGGGGAAAGCT
TTAGGGAAAGAAAAAGAAGCTGAAGATTTACTTAAAAAGTACGATGATAAAG
TAGCTGCATTCCAAAAAGATGCAAAGCAAAGTATAAAGATGCATGGCCATT
GAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCCGTGCTGATCATAACAAGAATTTATGCTGGTG
GATATGCTGGTGAAATCTTAAATGATTTAGGATTCAAACGTAATAAAGACTTA
CAAAAACAAGTTGATAATGGTAAAGATATTATCCA ACTTACATCTAAAGAAA
GCATTCCATTAATGAACGCTGATCATATTTTTGTAGTAAAATCAGATCCAAAT
GCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAAGACTGAAAGCGAATGGACTTCAAGTA
AAGAGTGGAAAAATTTAGACGCAGTTAAAAACAACCAAGTATCTGATGATTT
AGATGAAATCACTTGGA ACTTAGCTGGCGGATATAAATCTTCATTA AAACTTA
TTGACGATTTATATGAAAAGTTAAATATTGAAAAACAATCAAAATAA
(SEQ ID NO:458)

FIG. 113

ATGAATAAAGTAATTA AAAATGCTTGTGTTACGCTTGCTTTCCTACTTGTTTTA
GCAGGATGTAGTGGGAATTCAAATAAACAATCATCTGATAACAAAGATAAGG
AAACA ACTTCAATTAACATGCAATGGGTACA ACTGAAATTAAGGGAAACC
AAAGCGTGTGTTACGCTATATCAAGGTGCCACTGACGTCGCTGTATCTTTAG
GTGTTAAACCTGTAGGTGCTGTAGAATCATGGACACAAAAACCGAAATTCGA
ATACATAAAAAATGATTTAAAAGATACTAAGATTGTAGGTCAAGAACCTGCA
CCTAACTTAGAGGAAATCTCTAAATTA AACCGGACTTAATTGTCGCGTCAAA
AGTTAGAAATGAAAAAGTTTACGATCAATTATCTAAAATCGCACCAACAGTTT
CTACTGATACAGTTTTCAAATTC AAAGATACTAACTAAGTTAATGGGGAAAGCT
TTAGGGAAAGAAAAAGAAGCTGAAGATTTACTTAAAAAGTACGATGATAAAG
TAGCTGCATTCCAAAAAGATGCAAAGCAAAGTATAAAGATGCATGGCCATT
GAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCCGTGCTGATCATAACAAGAATTTATGCTGGTG
GATATGCTGGTGAAATCTTAAATGATTTAGGATTCAAACGTAATAAAGACTTA
CAAAAACAAGTTGATAATGGTAAAGATATTATCCA ACTTACATCTAAAGAAA
GCATTCCATTAATGAACGCTGATCATATTTTTGTAGTAAAATCAGATCCAAAT
GCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAAGACTGAAAGCGAATGGACTTCAAGTA

60/112

AAGAGTGGAAAAATTTAGACGCAGTTAAAAACAACCAAGTATCTGATGATTT
AGATGAAATCACTTGGAAGTTAGCTGGCGGATATAAATCTTCATTA AAACTTA
TTGACGATTTATATGAAAAGTTAAATATTGAAAAACAATCAAAATAA
(SEQ ID NO:459)

FIG. 114

ATGAATAAAGTAATTA AAAATGCTTGTTGTTACGCTTGCTTTCCTACTTGTTTTA
GCAGGATGTAGTGGGAATTCAAATAACAATCATCTGATAACAAAGATAAGG
AAACAACCTCAATTAACATGCAATGGGTACAAC TGAAATTAAGGGAAACC
AAAGCGTGTGTTACGCTATATCAAGGTGCCACTGACGTCGCTGTATCTTTAG
GTGTTAAACCTGTAGGTGCTGTAGAATCATGGACACAAAAACCGAAATTCGA
ATACATAAAAAATGATTTAAAAGATACTAAGATTGTAGGTCAAGAACCTGCA
CCTAACTTAGAGGAAATCTCTAAATTA AACCGGACTTAATTGTCGCGTCAAAA
AGTTAGAAATGAAAAAGTTTACGATCAATTATCTAAAATCGCACCAACAGTTT
CTACTGATACAGTTTTCAAATCAAAGATACA ACTAAGTTAATGGGGAAAGCT
TTAGGGAAAGAAAAAGAAGCTGAAGATTTACTTAAAAAGTACGATGATAAAG
TAGCTGCATTCCAAAAAGATGCAAAAAGCAAAGTATAAAGATGCATGGCCATT
GAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCCGTGCTGATCATA CAAGAATTIATGCTGGTG
GATATGCTGGTGAAATCTTAAATGATTTAGGATTCAAACGTAATAAAGACTTA
CAAAAACAAGTTGATAATGGTAAAGATATTATCCA ACTTACATCTAAAGAAA
GCATTCCATTAAATGAACGCTGATCATATTTTTGTAGTAAAATCAGATCCAAAT
GCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAGACTGAAAGCGAATGGACTTCAAGTA
AAGAGTGGAAAAATTTAGACGCAGTTAAAAACAACCAAGTATCTGATGATTT
AGATGAAATCACTTGGAAGTTAGCTGGCGGATATAAATCTTCATTA AAACTTA
TTGACGATTTATATGAAAAGTTAAATATTGAAAAACAATCAAAATAA
(SEQ ID NO:460)

FIG. 115

ATGAATAAAGTAATTA AAAATGCTTGTTGTTACGCTTGCTTTCCTACTTGTTTTA
GCAGGATGTAGTGGGAATTCAAATAACAATCATCTGATAACAAAGATAAGG
AAACAACCTCAATTAACATGCAATGGGTACAAC TGAAATTAAGGGAAACC
AAAGCGTGTGTTACGCTATATCAAGGTGCCACTGACGTCGCTGTATCTTTAG
GTGTTAAACCTGTAGGTGCTGTAGAATCATGGACACAAAAACCGAAATTCGA
ATACATAAAAAATGATTTAAAAGATACTAAGATTGTAGGTCAAGAACCTGCA

61/112

CCTAACTTAGAGGAAATCTCTAAATTA AAAACCGGACTTAATTGTCGCGTCAAA
AGTTAGAAATGAAAAAGTTTACGATCAATTATCTAAAATCGCACCAACAGTTT
CTACTGATACAGTTTTCAAATTC AAAGATACA ACTAAGTTAATGGGGAAAGCT
TTAGGGAAAGAAAAAGAAGCTGAAGATTTACTTAAAAAGTACGATGATAAAG
TAGCTGCATTCCAAAAAGATGCAAAAGCAAAGTATAAAGATGCATGGCCATT
GAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCCGTGCTGATCATAACAAGAATTTATGCTGGTG
GATATGCTGGTGAAATCTTAAATGATTTAGGATTCAAACGTAATAAAGACTTA
CAAAAACAAGTTGATAATGGTAAAGATATTATCCA ACTTACATCTAAAGAAA
GCATTCCATTAATGAACGCTGATCATATTTTTGTAGTAAAATCAGATCCAAAT
GCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAAGACTGAAAGCGAATGGACTTCAAGTA
AAGAGTGGAAAAATTTAGACGCAGTTAAAAACAACCAAGTATCTGATGATTT
AGATGAAATCACTTGGA ACTTAGCTGGCGGATATAAATCTTCATTA AAAACTTA
TTGACGATTTATATGAAAAGTTAAATATTGAAAACAATCAAAAATAA
(SEQ ID NO:461)

FIG. 116

ATGAATAAAGTAATTA AAAATGCTTGTTGTTACGCTTGCTTTCCTACTTGTTTTA
GCAGGATGTAGTGGGAATTCAAATAACAATCATCTGATAACA AAGATAAGG
AAACA ACTTCAATTAACATGCAATGGGTACA ACTGAAATTA AAGGGAAACC
AAAGCGTGTGTTACGCTATATCAAGGTGCCACTGACGTCGCTGTATCTTTAG
GTGTTAAACCTGTAGGTGCTGTAGAATCATGGACACAAAAACCGAAATTCGA
ATACATAAAAAATGATTTAAAAGATACTAAGATTGTAGGTCAAGAACCTGCA
CCTAACTTAGAGGAAATCTCTAAATTA AAAACCGGACTTAATTGTCGCGTCAAA
AGTTAGAAATGAAAAAGTTTACGATCAATTATCTAAAATCGCACCAACAGTTT
CTACTGATACAGTTTTCAAATTC AAAGATACA ACTAAGTTAATGGGGAAAGCT
TTAGGGAAAGAAAAAGAAGCTGAAGATTTACTTAAAAAGTACGATGATAAAG
TAGCTGCATTCCAAAAAGATGCAAAAGCAAAGTATAAAGATGCATGGCCATT
GAAAGCTTCAGTTGTTAACTTCCGTGCTGATCATAACAAGAATTTATGCTGGTG
GATATGCTGGTGAAATCTTAAATGATTTAGGATTCAAACGTAATAAAGACTTA
CAAAAACAAGTTGATAATGGTAAAGATATTATCCA ACTTACATCCAAAGAAA
GCATTCCATTAATGAACGCTGATCATATTTTTGTAGTAAAATCAGATCCAAAT
GCGAAAGATGCTGCATTAGTTAAAAAGACTGAAAGCGAATGGACTTCAAGTA
AAGAATGGAAAAATTTAGACGCAGTTAAAAACAACCAAGTATCTGATGATTT

62/112

AGATGAAATCACTTGGAAGCTAGCTGGCGGATATAAATCATCATTAAAATTGA
TTGACGATTTATATGAAAAGTTAAATATTGAAAAACAATCAAAATAA
(SEQ ID NO:462)

FIG. 117

AAAGAATCATCAACTAAAGATACTATTTTCGGTAAAAGATGAAAATGGTACAG
TAAAAGTACCTAAAGATGCAAAACGTATCGTTGTATTAGAGTACTCATTGCA
GATGCATTAGCAGCATTAGACGTTAAACCAGTTGGTATTGCTGATGATGGTAA
GAAAAACGTATCATTAAACCAGTTAGAGAAAAAATTGGGGATTATACTTCTG
TAGGTACACGTAAACAGCCAAACTTAGAGGAAATTAGTAAATTAACCGGA
TTAATTATCGCTGATAGCAGTAGACATAAAGGTATTAATAAAGAATTAACA
AAATTGCACCAACATTATCATTAAAGAGTTTTGATGGAGACTACAAACAAAAC
ATTAATTCGTTCAAAACAATTGCTAAAGCTTTAAATAAAGAAAAAGAAGCG
AAAAGCGTCTTGCTGAACATGATAAATTAATCAAAAAGTATAAAGATGAAAT
TAAGTTTGATAGAAATCAAAAAGTGCTTCCAGCAGTTGTTGCTAAAGCTGGTT
TATTAGCACATCCAACTATTCATATGTTGGACAATTTTTAAACGAACTTGGAT
TTAAAAATGCATTAAGTGATGATGTAACAAAAGGTTAAGTAAATACTTGAAA
GGACCTTACTTACAATTAGATACTGAACATTTAGCTGACTTAAATCCTGAACG
CATGATTATTATGACAGATAATGCTAAAAAGATTCTGCTGAATTCAAGAAGT
TACAAGAAGATCCAACTTGGA AAAAGTTGAACGCAGTTAAAAATAATCGCGT
GGATATTGTTGACCGTGATGTTTGGGCAAGATCTCGTGGCTTAATTTCTTCTGA
AGAAATGGCTAAAGAACTTGTTGAATTATCAAAAAAGAACAAAAG
(SEQ ID NO:463)

FIG. 118

ATGAAGTTATACATATTAAGGAGTGGAACGATGAGAGGTCTAAAACTTTTAG
TATATTGGGATTAATAGTTGCCTTATTTTTAGTTGCAGCTTGTGGIAATACGGA
TAATTCAAGTAAAAAGAATCATCAACTAAAGATACTATTTTCGGTAAAAGATG
AAAATGGCACAGTAAAAGTACCTAAAGATGCAAAACGTATCGTTGTATTAGA
GTACTCATTTCAGATGCATTAGCAGCATTAGACGTTAAACCAGTTGGTATTG
CTGATGATGGTAAGAAAAACGTATCATTAAACCAGTTAGAGAAAAAATTGG
GGATTATACTTCTGTAGGTACACGTAAACAGCCAAACTTAGAGGAAATTAGTA
AATTAACCGGATTTAATTATCGCTGATAGCAGTAGACATAAAGGTATTAAT
AAAGAATTAACAAAATTGCACCAACATTATCATTAAAGAGTTTTGATGGAGA

63/112

CTACAAACAAAACATTAATTCGTTCAAAACAATTGCTAAAGCTTTAAATAAAG
AAAAAGAAGGCGAAAAGCGTCTTGCTGAACATGATAAATTAATCAAAAAGTA
TAAAGATGAAATTAAGTTTGATAGAAATCAAAAAGTGCTTCCAGCAGTTGTTG
CTAAAGCTGGTTTATTAGCACATCCAAACTATTCATATGTTGGACAATTTTAA
ACGAACTTGGAATTTAAAAATGCATTAAGTGATGATGTAACAAAAGGTTAAGT
AAATACTTGAAAGGACCTTACTTACAATTAGATACTGAACATTTAGCTGACTT
AAATCCTGAACGCATGATTATTATGACAGATAATGCTAAAAAAGATTCTGCTG
AATTCAAGAAGTTACAAGAAGATCCAACCTTGAAAAAGTTGAATGCAGTTAA
AAATAATCGCGTGGATATTGTTGACCGTGATGTTTGGGCAAGATCTCGTGGCT
TAATTTCTTCTGAAGAAATGGCTAAAGAACTTGTTGAATTATCAAAAAAAGAA
CAAAAGTAA

(SEQ ID NO:464)

FIG. 119

ATGAGAGGTCTAAAACTTTTAGTATATTGGGATTAATAGTTGCCTTACTTTTA
GTTGCAGCTTGTGGTAATACGGATAATTCAAGTAAAAAAGAATCATCAACTAA
AGATACTATTTCCGGTAAAAGATGAAAATGGTACAGTAAAAGTACCTAAAGAT
GCAAAACGTATCGTTGTATTAGAGTACTCATTGTCAGATGCATTAGCAGCATT
AGACGTTAAACCAGTTGGTATTGCTGATGATGGTAAGAAAAAACGTATCATTAA
AACCAGTTAGAGAAAAAATTGGGGATTATACTTCTGTAGGTACACGTAAACA
GCCAACTTAGAGGAAATTAGTAAATTAACCGGATTTAATTATCGCTGATA
GCAGTAGACATAAAGGTATTAATAAAGAATTAACAAAATTGCACCAACATT
ATCATTAAAGAGTTTTGATGGGAGACTACAAACAAAATATTAATTCGTTCAAAA
CAATTGCTAAAGCTTTAAATAAAGAAAAAGAAGGCGAAAAACGTCTTGCTGA
GCATGATAAATTAATCAATAAGTATAAAGATGAAATTAATTTGATAGAAATC
AAAAAGTGCTTCCAGCAGTAGTTGCTAAAGCTGGTTTATTAGCACATCCAAAC
TATTCATATGTTGGACAATTTTTAAACGAACTAGGATTTAAAAATGCATTAAG
TGACGATGTAACAAAAGGTTTAAAGTAAATATTTGAAAGGACCTTACTTACAAT
TAGACACTGAACATTTAGCTGATTTAAATCCAGAGCGTATGATCATTATGACA
GATCATGCTAAAAAAGATTCTGCTGAATTCAGAAGTTACAAGAAGATGCAA
CATGGAAAAAGTTGAATGCAGTTAAAAATAATCGCGTGGATATTGTTGACCGT
GATGTTTGGGCAAGATCTCGTGGCTTAATTTCTTCTGAAGAAATGGCTAAAGA
ACTTGTTGAATTATCAAAAAAAGAACAAAAGTAA

(SEQ ID NO:465)

FIG. 120

ATGAGAGGTCTAAAACTTTTAGTATATTGGGATTAATAGTTGCCTTATTTTAA
GTTGCAGCTTGTGGTAATACGGATAATTCAAGTAAAAAGAATCATCAACTAA
AGATACTATTTTCGGTAAAAGATGAAAATGGTACAGTAAAAGTACCTAAAGAT
GCAAAACGTATCGTTGTATTAGAGTACTCATTTCAGATGCATTAGCAGCATT
AGACGTTAAACCAGTTGGTATTGCTGATGATGGTAAGAAAAAACGTATCATTAA
AACCAGTTAGAGAAAAAATTCGGGATTATACTTCTGTAGGTACACGTAAACAG
CCAACTTAGAGGAAATTAGTAAATTAACCGGATTTAATTATCGCTGATAG
CAGTAGACATAAAGGTATTAATAAAGAATTAACAAAATTGCACCAACATTA
TCATTAAAGAGTTTTGATGGTACTACAAGCAAATATCGATGCTTTCAGAC
AATTGCGAAAGCTTTAGATAAAGAAAAAGAAGGCGAAAAACGTCTTGCTGAA
CATGATAAATTAATCAATAAGTATAAAGATGAAATTAATTTGATAGAAATCA
AAAAGTGCTTCCAGCAGTTGTTGCGAAAGCTGGTTTATTAGCACATCCAACT
ATTCGTATGTTGGACAATTTTTAAACGAACTTGGATTTAAAATGCATTAAGT
GATGATGTAACAAAAGGTTTAAAGTAAATACTTGAAAGGACCTTACTTACAATT
AGATACTGAACATTTAGCTGACTTAAATCCTGAACGCATGATTATTATGACAG
ATAATGCTAAAAAAGATTCTGCTGAATTCAAGAAGTTACAAGAAGATGCAAC
ATGGAAAAAATTGAATGCAGTTAAAAATAATCGIGTTGATATTGTTGACCGTG
ATGTTTGGGCAAGATCTCGTGGCTTAATTTCTTCTGAAGAAATGGCTAAAGAA
CTTGTTGAATTATCAAAAAAGAACAAAAGTAA

(SEQ ID NO:466)

FIG. 121

ATGAGAGGTCTAAAACTTTTAGTATATTGGGATTAATAGTTGCCTTACTTTTAA
GTTGCAGCTTGTGGTAATACGGATAATTCAAGTAAAAAGAATCATCAACTAA
AGATACTATTTTCGGTAAAAGATGAAAATGGTACAGTAAAAGTACCTAAAGAT
GCAAAACGTATCGTTGTATTAGAGTACTCATTTCAGATGCATTAGCAGCATT
AGACGTTAATCCAGTTGGTATTGCTGATGATGGTAAGAAAAAACGTATCATTAA
AACCAGTTAGAGAAAAAATTTGGGATTATACTTCTGTAGGTACACGTAAACA
GCCAACTTAGAAGAAATTAGTAAATTAACCGGATTTAATTATCGCTGATA
GCAGTAGACATAAAGGTATTAATAAAGAATTAACAAAATTGCACCAACATT
ATCATTAAAGAGTTTTGATGGAGACTACAAACAAAACATTAATTTCGTTCAAAA
CAATTGCTAAAGCTTTAAATAAAGAAAAAGAAGGCGAAAAACGTCTTGCTGA

65/112

GCATGATAAATTAATCAATAAGTATAAAGATGAAATTAATTTGATAGAAATC
AAAAAGTGCTTCCAGCAGTAGTTGCTAAAGCTGGTTTATTAGCACATCCAAAC
TATTCATATGTTGGACAATTTTTAAACGAACTAGGATTTAAAAATGCATTAAG
TGACGATGTAACAAAAGGTTTAAAGTAAATATTTGAAAGGACCTTACTTACAAT
TAGACACTGAACATTTAGCTGATTTAAATCCAGAGCGTATGATCATTATGACT
GATCACGCTAAAAAAGATTCTGCTGAATTCAAGAAATTACAAGAAGATGCAA
CATGGAAAAAATTGAATGCAGTTAAAAATAATCGCGTGGATATTGTTGACCGT
GATGTTTGGGCAAGATCTCGTGGCTTAATTTCTTCTGAAGAAATGGCTAAAGA
ACTTGTGAATTATCAAAAAAAGAACAAAAGTAA

(SEQ ID NO:467)

FIG. 122

ATGAGAGGTCTAAAACTTTTAGTATATTGGGATTAATAGTTGCCTTACTTTTA
GTTGCAGCTTGTGGTAATACGGATAATTCAAGTAAAAAAGAATCATCAACTAA
AGATACTATTTCCGGTAAAAGATGAAAATGGTACAGTAAAAGTACCTAAAGAT
GCAAAACGTATCGTTGTATTAGAGTACTCATTTGCAGATGCATTAGCAGCATT
AGACGTTAAACCAGTTGGTATTGCTGATGATGGTAAGAAAAAACGTATCATTAA
AACCAGTTAGAGAAAAAATTGGGGATTATACTTCTGTAGGTACACGTAAACA
GCCAACTTAGAAGAAATTAGTAAATTAACCGGATTTAATTATCGCTGATA
GCAGTAGACATAAAGGTATTAATAAAGAATTAACAAAATTGCACCAACATT
ATCATTAAAGAGTTTTGATGGAGACTACAAACAAAATATTAATTCGTTCAAAA
CAATTGCTAAAGCTTTAAATAAAGAAAAAGAAGGCGAAAAACGTCTTGCTGA
GCATGATAAATTAATCAATAAGTATAAAGATGAAATTAATTTGATAGAAATC
AAAAAGTGCTTCCAGCAGTAGTTGCTAAAGCTGGTTTATTAGCACATCCAAAC
TATTCATATGTTGGACAATTTTTAAACGAACTAGGATTTAAAAATGCATTAAG
TGACGATGTAACAAAAGGTTTAAAGTAAATATTTGAAAGGACCTTACTTACAAT
TAGACACTGAACATTTAGCTGATTTAAATCCAGAGCGTATGATCATTATGACA
GATCATGCTAAAAAAGATTCTGCTGAATTCAAGAAGTTACAAGAAGATGCAA
CATGGAAAAAGTTGAATGCAGTTAAAAATAATCGCGTGGATATTGTTGACCGT
GATGTTTGGGCAAGATCTCGTGGCTTAATTTCTTCTGAAGAAATGGCTAAAGA
ACTTGTGAATTATCAAAAAAAGAACAAAAGTAA

(SEQ ID NO:468)

FIG. 123

ATGAGAGGTCTAAAACTTTTAGTATATTGGGATTAATAGTTGCCTTACTTTTA
GTTGCAGCTTGTGGTAATACGGATAATTCAAGTAAAAAGAATCATCAACTAA
AGATACTATTTTCGGTAAAAGATGAAAATGGTACAGTAAAAGTACCTAAAGAT
GCAAAACGTATCGTTGTATTAGAGTACTCATTTCAGATGCATTAGCAGCATT
AGACGTTAAACCAGTTGGTATTGCTGATGATGGTAAGAAAAAACGTATCATT
AACCAGTTAGAGAAAAAATTGGGGATTATACTTCTGTAGGTACACGTAAACA
GCCAAACTTAGAGGAAATTAGTAAATTAACCGGATTTAATTATCGCTGATA
GCAGTAGACATAAAGGTATTAATAAAGAATTAACAAAATTGCACCAACATT
ATCATTAAAGAGTTTTGATGGAGACTACAAACAAAATATTAATTCGTTCAAAA
CAATTGCTAAAGCTTTAAATAAAGAAAAAGAAGGCGAAAAACGTCTTGCTGA
GCATGATAAATTAATCAATAAGTATAAAGATGAAATTAATTTGATAGAAATC
AAAAAGTGCTCCAGCAGTAGTTGCTAAAGCTGGTTIATTAGCACATCCAAAC
TATTCATATGTTGGACAATTTTTAAACGAACTAGGATTTAAAAATGCATTAAG
TGACGATGTAACAAAAGGTTAAGTAAATATTTGAAAGGACCTTACTTACAAT
TAGACACTGAACATTTAGCTGATTTAAATCCAGAGCGTATGATCATTATGACA
GATCATGCTAAAAAAGATTCTGCTGAATTCAAGAAGTTACAAGAAGATGCAA
CATGGAAAAAGTTGAATGCAGTTAAAAATAATCGCGTGGATATTGTTGACCGT
GATGTTTGGGCAAGATCTCGTGGCTTAATTTCTTCTGAAGAAATGGCTAAAGA
ACTTGTTGAATTATCAAAAAAGAACAAGTAA

(SEQ ID NO:469)

FIG. 124

ATGAGAGGTCTAAAACTTTTAGTATATTGGGATTAATAGTTGCCTTACTTTTA
GTTGCAGCTTGTGGTAATACGGATAATTCAAGTAAAAAGAATCATCAACTAA
AGATACTATTTTCGGTAAAAGATGAAAATGGTACAGTAAAAGTACCTAAAGAT
GCAAAACGTATCGTTGTATTAGAGTACTCATTTCAGATGCATTAGCAGCATT
AGACGTTAAACCAGTTGGTATTGCTGATGATGGTAAGAAAAAACGTATCATT
AACCAGTTAGAGAAAAAATTGGGGATTATACTTCTGTAGGTACACGTAAACA
GCCAAACTTAGAAGAAATTAGTAAATTAACCGGATTTAATTATCGCTGATA
GCAGTAGACATAAAGGTATTAATAAAGAATTAACAAAATTGCACCAACATT
ATCATTAAAGAGTTTTGATGGAGACTACAAACAAAATATTAATTCGTTCAAAA
CAATTGCTAAAGCTTTAAATAAAGAAAAAGAAGGCGAAAAACGTCTTGCTGA
GCATGATAAATTAATCAATAAGTATAAAGATGAAATTAATTTGATAGAAATC

67/112

AAAAAGTGCTTCCAGCAGTAGTTGCTAAAGCTGGTTTATTAGCACATCCAAAC
TATTCATATGTTGGACAATTTTTAAACGAACTAGGATTTAAAAATGCATTAAG
TGACGATGTAACAAAAGGTTTAAAGTAAATATTTGAAAGGACCTTACTTACAAT
TAGACACTGAACATTTAGCTGATTTAAATCCAGAGCGTATGATCATTATGACA
GATCATGCTAAAAAAGATTCTGCTGAATTCAAGAAGTTACAAGAAGATGCAA
CATGGAAAAAGTTGAATGCAGTTAAAAATAATCGCGTGGATATTGTTGACCGT
GATGTTTGGGCAAGATCTCGTGGCTTAATTTCTTCTGAAGAAATGGCTAAAGA
ACTTGTGAATTATCAAAAAAAGAACAAAAGTAA

(SEQ ID NO:470)

FIG. 125

ATGAGAGGTCTAAAACTTTTAGTATATTGGGATTAATAGTTGCCTTACTTTTA
GTTGCAGCTTGTGGTAATACGGATAATTCAAGTAAAAAAGAATCATCAACTAA
AGATACTATTTTCGGTAAAAGATGAAAATGGTACAGTAAAAGTACCTAAAGAT
GCAAAACGTATCGTTGTATTAGAGTACTCATTGTCAGATGCATTAGCAGCATT
AGACGTTAAACCAGTTGGTATTGCTGATGATGGTAAGAAAAAACGTATCATT
AACCAGTTAGAGAAAAAATTGGGGATTATACTTCTGTAGGTACACGTAAACA
GCCAAACTTAGAAGAAATTAGTAAATTAACCAGGATTTAATTATCGCTGATA
GCAGTAGACATAAAGGTATTAATAAAGAATTAACAAAATTGCACCAACATT
ATCATTAAAGAGTTTTGATGGAGACTACAAACAAAATATTAATTCGTTCAAAA
CAATTGCTAAAGCTTTAAATAAAGAAAAAGAAGGCGAAAAACGTCTTGCTGA
GCATGATAAATTAATCAATAAGTATAAAGATGAAATTAATTTGATAGAAATC
AAAAAGTGCTTCCAGCAGTAGTTGCTAAAGCTGGTTTATTAGCACATCCAAAC
TATTCATATGTTGGACAATTTTTAAACGAACTAGGATTTAAAAATGCATTAAG
TGACGATGTAACAAAAGGTTTAAAGTAAATATTTGAAAGGACCTTACTTACAAT
TAGACACTGAACATTTAGCTGATTTAAATCCAGAGCGTATGATCATTATGACA
GATCATGCTAAAAAAGATTCTGCTGAATTCAAGAAGTTACAAGAAGATGCAA
CATGGAAAAAGTTGAATGCAGTTAAAAATAATCGCGTGGATATTGTTGACCGT
GATGTTTGGGCAAGATCTCGTGGCTTAATTTCTTCTGAAGAAATGGCTAAAGA
ACTTGTGAATTATCAAAAAAAGAACAAAAGTAA

(SEQ ID NO:471)

FIG. 126

ATGAGAGGTCTAAAACTTTTAGTATATTGGGATTAATAGTTGCCTTACTTTTA
GTTGCAGCTTGTGGTAATACGGATAATTCAAGTAAAAAAGAATCATCAACTAA
AGATACTATTTTCGGTAAAAGATGAAAATGGTACAGTAAAAGTACCTAAAGAT
GCAAAACGTATCGTTGTATTAGAGTACTCATTTGCAGATGCATTAGCAGCATT
AGACGTTAAACCAGTTGGTATTGCTGATGATGGTAAGAAAAAACGTATCATTAA
AACCAGTTAGAGAAAAAATTGGGGATTATACTTCTGTAGGTACACGTAAACA
GCCAACTTAGAAGAAATTAGTAAATTA AACCCGGATTTAATTATCGCTGATA
GCAGTAGACATAAAGGTATTAATAAAGAATTAACAAAATTGCACCAACATT
ATCATTAAGAGTTTTGATGGAGACTACAAACAAAATATTAATTCGTTCAAAA
CAATTGCTAAAGCTTTAAATAAAGAAAAAGAAGGCGAAAAACGTCTTGCTGA
GCATGATAAATTAATCAATAAGTATAAAGATGAAATTAATTTGATAGAAATC
AAAAAGTGCTTCCAGCAGTAGTTGCTAAAGCTGGTTTATTAGCACATCCAAAC
TATTCATATGTTGGACAATTTTTAAACGAACTAGGATTTAAAAATGCATTAAG
TGACGATGTAACAAAAGGTTTAAGTAAATATTTGAAAGGACCTTACTTACAAT
TAGACACTGAACATTTAGCTGATTTAAATCCAGAGCGTATGATCATTATGACA
GATCATGCTAAAAAAGATTCTGCTGAATTCAAGAAGTTACAAGAAGATGCAA
CATGGAAAAAGTTGAATGCAGTTAAAAATAATCGCGTGGATATTGTTGACCGT
GATGTTTGGGCAAGATCTCGTGGCTTAATTTCTTCTGAAGAAATGGCTAAAGA
ACTTGTTGAATTATCAAAAAAAGAACAAAAGTAA

(SEQ ID NO:472)

FIG. 127

ATGAGAGGTCTAAAACTTTTAGTATATTGGGATTAATAGTTGCCTTACTTTTA
GTTGCAGCTTGTGGTAATACGGATAATTCAAGTAAAAAAGAATCATCAACTAA
AGATACTATTTTCGGTAAAAGATGAAAATGGTACAGTAAAAGTACCTAAAGAT
GCAAAACGTATCGTTGTATTAGAGTACTCATTTGCAGATGCATTAGCAGCATT
AGACGTTAATCCAGTTGGTATTGCTGATGATGGTAAGAAAAAACGTATCATTAA
AACCAGTTAGAGAAAAAATTGGGGATTATACTTCTGTAGGTACACGTAAACA
GCCAACTTAGAAGAAATTAGTAAATTA AACCCGGATTTAATTATCGCTGATA
GCAGTAGACATAAAGGTATTAATAAAGAATTAACAAAATTGCACCAACATT
ATCATTAAGAGTTTTGATGGAGACTACAAACAAAACATTAATTCGTTCAAAA
CAATTGCTAAAGCTTTAAATAAAGAAAAAGAAGGCGAAAAACGTCTTGCTGA
GCATGATAAATTAATCAATAAGTATAAAGATGAAATTAATTTGATAGAAATC

69/112

AAAAAGTGCTTCCAGCAGTAGTTGCTAAAGCTGGTTTATTAGCACATCCAAAC
TATTCATATGTTGGACAATTTTTAAACGAACTAGGATTTAAAAATGCATTAAG
TGACGATGTAACAAAAGGTTTAAAGTAAATATTTGAAAGGACCTTACTTACAAT
TAGACACTGAACATTTAGCTGATTTAAATCCAGAGCGTATGATCATTATGACT
GATCACGCTAAAAAAGATTCTGCTGAATTCAAGAAATTACAAGAAGATGCAA
CATGGAAAAAATTGAATGCAGTTAAAAATAATCGCGTGGATATTGTTGACCGT
GATGTTTGGGCAAGATCTCGTGGCTTAATTTCTTCTGAAGAAATGGCTAAAGA
ACTTGTGGAATTATCAAAAAAGAACAAAAGTAA

(SEQ ID NO:473)

FIG. 128

ACTGAAGAGAAAAGTGAATGACGACAATAAAAGATGAATTAGGAACTGAAA
AAATTAAGAAAAATCCTAAACGTGTTGTTGTATTAGAATATAGTTTTGCTGAT
TATTTAGCAGCATTAGATATGAAACCTGTTGGTATTGCAGATGATGGCAGCAG
TAAAAATATAACAAAGTCAGTAAGAGATAAGATTGGGGCATATGAATCGGTT
GGATCTAGATCGCAACCGAATATGGAAGTGATAAGTAAATTAACCGGATT
TGATCATTGCAGATGTCAGCAGACATAAGAAAATCAAATCAGAATTGAGCAA
AATTGCGCCGACAATTATGTTAGTCAGTGGTACGGGAGATTACAATGCAAATA
TTGAAGCATTTAAAACAGTCGCTAAAGCAGTTGGCAGAGAGAAAAGAAGGCGA
AAAGCGTCTGGAAAAGCATGATAAAATATTAGCGGAGATTAGAAAGAAAATT
GAACAGAGTACGTTAAAATCTGCATTTGCACTTGGTATCTCAAGAGCAGGTAT
GTTTATTAATAATGAAGATACATTTATGGGACAATTTTTAATTAATAATGGGTA
TTCAACCTGAAGTCACAAAAGACAAAAGTGCATGTGGGTGAACGCAAGGG
TGGCCCTTATATTTATTTAAATAATGAAGAGCTTGCCAATATCAATCCAAAAG
TTATGATTTTAGCCACTGACGGAAAAACGGACAAAATAGAACGAAATTCATT
GATCCTGCAGTTTGGAAATCATTAAAAGCTGTGAAAGATAACAAAGTTTATGA
CGTTGACCGAAATAAGTGGTTGAAATCAAGGGGTATTATCGCAAGTGAAAGT
ATGGCAGAAGATTTAGAAAAAATTGCAGAAAAAGCAAATAA

(SEQ ID NO:474)

FIG. 129

ATGGAAGTGATAAGTAAATTAACCGGATTTGATCATTGCAGATGTAAACAG
ACATAAGAAAATCAAATCAGAATTGAGCAAAATTGCTCCGACAATCATGTTA
GTTAGCGGTACGGGAGATTATAATGCAAATATTGAAGCATTTAAAACAGTTGC

70/112

TAAAGCAGTAGGCAAAGAGAAAAGAAGGCGAGAAACGTCTGGAAAAGCATGA
TAAAATATTAGCGGAGATTAGAAAAGAAAATTGAACAGAGTACGTTAAAATCT
GCATTTGCATTCGGTATCTCAAGAGCAGGTATGTTTATTAATAATGAAGATAC
ATTTATGGGACAATTCTTAATTAATAATGGGTATTCAACCTGAAGTCACAAAAG
ACAAAACCTATGCATGTTGGTGAACGCAAGGGTGGTCCTTATATTTATTTAAAT
AATGAAGAACTTGCCAATATCAATCCAAAAGTTATGATTTTAGCCACTGACGG
AAAAACGGACAAAAATAGAACGAAATTCATTGATCCTGCAGTTTGAAATCA
TTAAAAGCTGTGAAAGATAACAAAGTTTATGACGTTGACCGAAAATAAGTGGTT
GAAATCAAGGGGTATTATCGCAAGTGAAAGTATGGCAGAAGATTTAGAAAAA
ATTGCAGAAAAAGCAAAATAA

(SEQ ID NO:475)

FIG. 130

GTGAATAGGAATATCGTTAAATTAGTTGTGTTTATGCTAATCTTAGTTGTAGCA
GTAGCGGGTTGTGGTCAAAAAGATACTGAAGAGAAAACCTGAAATGACGACAA
TAAAAGATGAATTAGGAACTGAAAAAATTAAGAAAAATCCTAACGTTGTTGT
TGIATTAGAATATAGTTTTGCTGATTATTTAGCAGCATTAGATATGAAACCTGT
TGGTATTGCAGATGATGGCAGCACTAAAAATATAACAAAGTCAGTAAGAGAT
AAGATTGGGGCATATGAATCGGTTGGATCTAGACCGCAACCGAATATGGAAG
TGATAAGTAAATTAACCGGATTTGATCATTGCAGATGTTAGCAGACATAAG
AAAATCAAATCAGAATTGAGCAAAATTGCTCCGACAATCATGTTAGTTAGCGG
TACGGGAGATTATAATGCAAATATTGAAGCATTAAAACAGTCGCTAAAGCA
GTAGGCAAAGAGAAAAGAAGGCGAGAAGCGTCTGGAAAAGCATGATAAAATA
TTAGCGGAGATTAGAAAAGAAAATTGAACAGAGTACGTTAAAATCTGCATTTGC
ATTCGGTATCTCAAGAGCAGGTATGTTTATTAATAATGAAGATACATTTATGG
GACAATTCTTAATTAATAATGGGTATTCAACCTGAAGTCACAAAAGACAAAAC
ACGCATGTTGGTGAACGCAAGGGTGGTCCTTATATATATTTAAATAATGAAGA
ACTTGCCAATATCAATCCAAAAGTTATGATTTTAGCCACTGACGGAAAAACGG
ACAAAATAGAACGAAATTCATTGATCCTGCAGTTTGAAATCATTAAAAGCT
GTGAAAGATAACAAAGTTTATGACGTTGACCGAAAATAAGTGGTTGAAATCAA
GGGGGATTATCGCAAGTGAAAGTATGGCAGAAGATTTAGAAAAAATTGCAGA
AAAAGCAAAATAA

(SEQ ID NO:476)

FIG. 131

GTGAATAGGAATATCGTTAAATTAGTTGTGTTTATGCTAATCTTAGTTGTAGCA
GTAGCGGGTTGTGGTCAAAAAGATACTGAAGAGAAAAGTAAATGACGACGA
TAAAAGATGAATTAGGAACTGAAAAATTAAGAAAAATCCGAAACGTATTGT
TGTATTAGAATATAGTTTTGCTGATTATTTAGCAGCATTAGATATGAAACCTGT
TGGTATTGCAGATGATGGTAGTACTAAAAATATAACAAAGTCAGTAAGAGAT
AAGATTGGGGCATATGAATCGGTTGGATCTAGACCGCAACCGAATATGGAAG
TGATAAGTAAATTAACCAGGATTTGATTATTGCAGATGTCAGCAGACATAAG
AAAATCAAATCAGAATTGAGCAAAATTGCGCCGACAATCATGTTAGTTAGCG
GTACGGGAGATTACAATGCAAATATTGAAGCATTAAAAACAGTCGCTAAAGC
AGTTGGCAAAGAGAAAAGGCGAAAAGCGTCTGGAAAAGCATAATAAAAT
ATTAGCGGAGATTAGAAAAGAAAATTGAACAGAGTACGTTAAAAATCTGCATTT
GCATTTGGTATCTCAAGAGCAGGTATGTTTATTAATAATGAAGATACATTTAT
GGGACAATTCTTAATTAATAATGGGTATTCAACCTGAAGTCACAAAAGACAAA
ACTGCGCATGTTGGTGAACGCAAGGGTGGCCCTTATATTTATTTAAATAATGA
AGAGCTTGCCAATATCAATCCAAAAGTTATGATTTTAGCTACGAATGGAAAAA
CAGATAAAAATAGAACGAAATTCATTGATCCTGCAGTTTGGAAATCATTAAAA
GCTGTGAAAGATAATAAAGTATATGATGTTGATCGAAATAAGTGGTTGCAATC
AAGAGGTATTATGGCAAGTGAAAGTATGGCAGAAGATTTAGAAAAAATTGCA
GAAAAAGCAAAATAA

(SEQ ID NO:477)

FIG. 132

GTGAATAGGAATATCGTTAAACTAGTTGTGTTTATGCTAATCTTAGTTGTAGCA
GTAGCGGGTTGTGGTCAAAAAGATACTGAAGAGAAAAGTAAATGACGACAA
TAAAAGATGAATTAGGAACTGAAAAATTAAGAAAAATCCTAAACGTGTTGT
TGTATTAGAATATAGTTTTGCTGATTATTTAGCAGCATTAGATATGAAACCTGT
TGGTATTGCAGATGATGGCAGCAGTAAAAATATAACAAAGTCAGTAAGAGAT
AAGATTGGGGCATATGAATCGGTTGGATCTAGACCGCAACCGAATATGGAAG
TGATAAGTAAATTAACCAGGATTTGATCATTGCAGATGTTAGCAGACATAAG
AAAATCAAATCAGAATTGAGCAAAATTGCGCCGACAATTATGTTAGTCAGTGG
TACGGGAGATTACAATGCAAATATTGAAGCATTAAAAACAGTCGCTAAAGCA
GTTGGCAAAGAGAAAAGGCGAGAAGCGTCTGGAAAAGCATGATAAAAATAT
TAGCGGAGATTAGAAAAGAAAATTGAACAGAGTACGTTAAAAATCTGCATTTGC

72/112

ATTCGGTATCTCAAGAGCAGGTATGTTTATTAATAATGAAGATACATTTATGG
GACAATTCTTACTTAAAATGGGTATTCAACCTGAAGTCACAAAAGACAAAAC
ACGCATGTTGGTGAACGCAAGGGTGGTCCTTATATATATTTAAATAATGAAGA
ACTTGCCAATATCAATCCAAAAGTTATGATTTTAGCCACTGACGGGAAAACGG
ACAAAATAGAACGAAATTCATTGATCCTGCAGTTTGGAAATCATTAAGCT
GTGAAAGATAACAAAGTTTATGACGTTGACCGAAATAAGTGGTTGAAATCAA
GGGGGATTATCGCAAGTGAAAGTATGGCAGAAGATTTAGAAAAAATTGCAGA
AAAAGCAAATAA

(SEQ ID NO:478)

FIG. 133

GTGAATAGGAATATCGTTAAACTAGTTGTGTTTCATGCTAATTTTAGTTGTAGCA
GTAGCGGGTTGTGGTCAAAAAGATACTGAAGAGAAAACCTGAAATGACGACAA
TAAAAGATGAATTAGGAACTGAAAAAATTAAGAAAAATCCTAAACGTGTTGT
TGTATTAGAATATAGTTTTGCTGATTATTTAGCAGCATTAGATATGAAACCTGT
TGGTATTGCAGATGATGGCAGCACTAAAAATATAACAAAGTCAGTAAGAGAT
AAGATTGGGGCATATGAATCGGTTGGATCTAGACCGCAACCGAATATGGAAG
TGATAAGTAAATTAACCAGGATTTGATCATTGCAGATGTTAGCAGACATAAG
AAAATCAAATCAGAATTGAGCAAAATTGCTCCGACAATCATGTTAGTTAGCGG
TACGGGAGATTATAATGCAAATATTGAAGCATTAAAAACAGTCGCTAAAGCA
GTAGGCAAAGAGAAAGAAGGCGAGAAGCGTCTGGAAAAGCATGATAAAATA
TTAGCGGAGATTAGAAAGAAAATTGAACAGAGTACGTTAAAATCTGCATTTGC
ATTCGGTATCTCAAGAGCAGGTATGTTTATTAATAATGAAGATACATTTATGG
GACAATTCTTAATTAATAATGGGTATTCAACCTGAAGTCACAAAAGACAAAAC
ACGCATGTTGGTGAACGCAAGGGTGGTCCTTATATATATTTAAATAATGAAGA
ACTTGCCAATATCAATCCAAAAGTTATGATTTTAGCCACTGACGGAAAACGG
ACAAAATAGAACGAAATTCATTGATCCTGCAGTTTGGAAATCATTAAGCT
GTGAAAGATAACAAAGTTTATGACGTTGACCGAAATAAGTGGTTGAAATCAA
GGGGGATTATCGCAAGTGAAAGTATGGCAGAAGATTTAGAAAAAATTGCAGA
AAAAGCAAATAA

(SEQ ID NO:479)

FIG. 134

GTGAATAGGAATATCGTTAAATTAGTTGTGTTTATGCTAATCTTAGITGTAGCA
GTAGCGGGTTGTGGTCAAAAAGATACTGAAGAGAAAACCTGAAATGACGACAA
TAAAAGATGAATTAGGAACTGAAAAAATTAAGAAAAATCCTAAACGTGTTGT
TGTATTAGAATATAGTTTTGCTGATTATTTAGCAGCATTAGATATGAAACCTGT
TGGTATTGCAGATGATGGCAGCACTAAAAATATAACAAAGTCAGTAAGAGAT
AAGATTGGGGCATATGAATCGGTTGGATCTAGACCGCAACCGAATATGGAAG
TGATAAGTAAATTA AACCGGATTTGATCATTGCAGATGTTAGCAGACATAAG
AAAATCAAATCAGAATTGAGCAAAATTGCTCCGACAATCATGTTAGTTAGCGG
TACGGGAGATTATAATGCAAATATTGAAGCATTAAAAACAGTCGCTAAAGCA
GTAGGCAAAGAGAAAAGAAGGCGAGAAGCGTCTGGAAAAGCATGATAAAATA
TTAGCGGAGATTAGAAAAGAAAATTGAACAGAGTACGTTAAAATCTGCATTTGC
ATTCGGTATCTCAAGAGCAGGTATGTTTATTAATAATGAAGATACATTTATGG
GACAATTCCTAATTA AAAATGGGTATTCAACCTGAAGTCACAAAAGACAAAACCT
ACGCATGTGGTGAACGCAAGGGTGGTCTTATATATATTTAAATAATGAAGA
ACTTGCCAATATCAATCCAAAAGTTATGATTTTAGCCACTGACGGAAAAACGG
ACAAAAATAGAACGAAATTCATTGATCCTGCAGTTTGGAAATCATTAAAAGCT
GTGAAAGATAACAAAGTTTATGACGTTGACCGAAAATAAGTGGTTGAAATCAA
GGGGGATTATCGCAAGTGAAAGTATGGCAGAAGATTTAGAAAAAATTGCAGA
AAAAGCAAATAA

(SEQ ID NO:480)

FIG. 135

ATGACGACAATAAAAAGATGAATTAGGAACTGAAAAAATTAAGAAAAATCCTA
AACGTGTTGTTGTATTAGAATATAGTTTTGCTGATTATTTAGCAGCATTAGATA
TGAAACCTGTTGGTATTGCAGATGATGGCAGCACTAAAAATATAACAAAGTCA
GTAAGAGATAAGATTGGGGCATATGAATCGGTTGGATCTAGACCGCAACCGA
ATATGGAAGTGATAAGTAAATTA AACCGGATTTGATCATTGCAGATGTTAGC
AGACATAAGAAAATCAAATCAGAATTGAGCAAAATTGCTCCGACAATCATGT
TAGTTAGCGGTACGGGAGATTATAATGCAAATATTGAAGCATTAAAAACAGTC
GCTAAAGCAGTAGGCAAAGAGAAAAGAAGGCGAGAAGCGTCTGGAAAAGCAT
GATAAAATATTAGCGGAGATTAGAAAAGAAAATTGAACAGAGTACGTTAAAAT
CTGCATTTGCATTCGGTATCTCAAGAGCAGGTATGTTTATTAATAATGAAGAT
ACATTTATGGGACAATTCCTAATTA AAAATGGGTATTCAACCTGAAGTCACAAA

74/112

AGACAAAACCTACGCATGTTGGTGAACGCAAGGGTGGTCCTTATATATATTTAA
ATAATGAAGAACTTGCCAATATCAATCCAAAAGTTATGATTTTAGCCACTGAC
GGAAAAACGGACAAAAATAGAACGAAATTCATTGATCCTGCAGTTTGGAAAT
CATTAAAAGCTGTGAAAGATAACAAAGTTTATGACGTTGACCGAAAATAAGTG
GTTGAAATCAAGGGGGATTATCGCAAGTGAAAGTATGGCAGAAGATTTAGAA
AAAATTGCAGAAAAAGCAAAATAA

(SEQ ID NO:481)

FIG. 136

GTGAATAGGAATATCGTTAAACTAGTTGTGTTTCATGCTAATTTTAGTTGTAGCA
GTAGCGGGTTGTGGTCAAAAAGATACTGAAGAGAAAACCTGAAATGACGACAA
TAAAAGATGAATTAGGAACTGAAAAAATTAAGAAAAATCCTAACCGTGTGTGT
TGTATTAGAATATAGTTTTGCTGATTATTTAGCAGCATTAGATATGAAACCTGT
TGGTATTGCAGATGATGGCAGCACTAAAAATATAACAAAGTCAGTAAGAGAT
AAGATTGGGGCATATGAATCGGTTGGATCTAGACCGCAACCGAATATGGAAG
TGATAAGTAAATTTAAACCGGATTTGATCATTGCAGATGTTAGCAGACATAAG
AAAATCAAATCAGAATTGAGCAAAAATTGCTCCGACAATCATGTTAGTTAGCGG
TACGGGAGATTATAATGCAAATATTGAAGCATTAAAAACAGTCGCTAAAGCA
GTAGGCAAAGAGAAAAGAAGGCGAGAAGCGTCTGGAAAAGCATGATAAAATA
TTAGCGGAGATTAGAAAAGAAAATTGAACAGAGTACGTTAAAATCTGCATTTGC
ATTCGGTATCTCAAGAGCAGGTATGTTTATTAATAATGAAGATACATTTATGG
GACAATTCCTAATTTAAATGGGTATTCAACCTGAAGTCACAAAAGACAAAACCT
ACGCATGTIGGTGAACGCAAGGGTGGTCCTTATATATATTTAAATAATGAAGA
ACTTGCCAATATCAATCCAAAAGTTATGATTTTAGCCACTGACGGAAAAACGG
ACAAAAATAGAACGAAATTCATTGATCCTGCAGTTTGGAAATCATTAAAAGCT
GTGAAAGATAACAAAGTTTATGACGTTGACCGAAAATAAGTGGTTGAAATCAA
GGGGGATTATCGCAAGTGAAAGTATGGCAGAAGATTTAGAAAAAATTGCAGA
AAAAGCAAAATAA

(SEQ ID NO:482)

FIG. 137

ATGACGACAATAAAAAGATGAATTAGGAACTGAAAAAATTAAGAAAAATCCTA
AACGTGTTGTTGTATTAGAATATAGTTTTGCTGATTATTTAGCAGCATTAGATA
TGAAACCTGTTGGTATTGCAGATGATGGCAGCACTAAAAATATAACAAAGTCA

75/112

GTAAGAGATAAGATTGGGGCATATGAATCGGTTGGATCTAGACCGCAACCGA
ATATGGAAGTGATAAGTAAATTTAAAACCGGATTTGATCATTGCAGATGTTAGC
AGACATAAGAAAATCAAATCAGAATTGAGCAAAAATTGCTCCGACAATCATGT
TAGTTAGCGGTACGGGAGATTATAATGCAAATATTGAAGCATTAAAAACAGTC
GCTAAAGCAGTAGGCAAAGAGAAAAGAAGGCGAGAAGCGTCTGGAAAAGCAT
GATAAAATATTAGCGGAGATTAGAAAAGAAAATTGAACAGAGTACGTTAAAAT
CTGCATTTGCATTTCGGTATCTCAAGAGCAGGTATGTTTATTAATAATGAAGAT
ACATTTATGGGACAATTCTTAATTTAAAATGGGTATTCAACCTGAAGTCACAAA
AGACAAAACACTACGCATGTTGGTGAACGCAAGGGTGGTCCTTATATATATTTAA
ATAATGAAGAACTTGCCAATATCAATCCAAAAGTTATGATTTTAGCCACTGAC
GGAAAACGGACAAAATAGAACGAAATTCATTGATCCTGCAGTTTGAAAAT
CATTAAAAGCTGTGAAAGATAACAAAGTTTATGACGTTGACCGAAATAAGTG
GTTGAAATCAAGGGGGATTATCGCAAGTGAAAGTATGGCAGAAGATTTAGAA
AAAATTGCAGAAAAGCAAAATAA

(SEQ ID NO:483)

FIG. 138

GTGAATAGGAATATCGTTAAACTAGTTGTGTTTATGCTAATCTTAGTTGTAGCA
GTAGCGGGTTGTGGTCAAAAAGATACTGAAGAGAAAACCTGAAATGACGACAA
TAAAAGATGAATTAGGAACTGAAAAAATTAAGAAAAATCCTAAACGTGTTGT
TGTATTAGAATATAGTTTTGCTGATTATTTAGCAGCATTAGATATGAAACCTGT
TGGTATTGCAGATGATGGCAGCAGTAAAAATATAACAAAGTCAGTAAGAGAT
AAGATTGGGGCATATGAATCGGTTGGATCTAGACCGCAACCGAATATGGAAG
TGATAAGTAAATTTAAAACCGGATTTGATCATTGCAGATGTTAGCAGACATAAG
AAAATCAAATCAGAATTGAGCAAAAATTGCGCCGACAATTATGTTAGTCAGTGG
TACGGGAGATTACAATGCAAATATTGAAGCATTAAAAACAGTCGCTAAAGCA
GTTGGCAAAGAGAAAAGAAGGCGAGAAGCGTCTGGAAAAGCATGATAAAATAT
TAGCGGAGATTAGAAAAGAAAATTGAACAGAGTACGTTAAAATCTGCATTTGC
ATTCGGTATCTCAAGAGCAGGTATGTTTATTAATAATGAAGATACATTTATGG
GACAATTCTTACTTAAAATGGGTATTCAACCTGAAGTCACAAAAGACAAAACCT
ACGCATGTTGGTGAACGCAAGGGTGGTCCTTATATATATTTAAATAATGAAGA
ACTTGCCAATATCAATCCAAAAGTTATGATTTTAGCCACTGACGGGAAAACGG
ACAAAATAGAACGAAATTCATTGATCCTGCAGTTTGAAAATCATTAAAAGCT
GTGAAAGATAACAAAGTTTATGACGTTGACCGAAATAAGTGGTTGAAATCAA

GGGGGATTATCGCAAGTGAAAGTATGGCAGAAGATTTAGAAAAAATTGCAGA
AAAAGCAAATAA
(SEQ ID NO:484)

FIG. 139

GGTAGCGACGATAATGGCTCGTCTAAATCGCCGTACCATAGAATTGTTTCGTT
AATGCCTAGTAATACTGAAATTTTATATGAATTAGGATTAGGTAAATACATAG
TTGGTGTTC AACGGTTGATGATTATCCAAAAGATGTGAAAAAGGGTAAGAAA
CAATTTGATGCTTTGAATCTAAATAAAGAGGAACTTTTAAAGGCAAAGCCAGA
TCTAATTCTTGCGCATGAGTCGCAAAGGCAACTGCAAATAAAGTATTGTTCAT
CATTAGAGAAACAAGGCATCAAAGTAGTGTATGTTAAAGATGCACAATCAAT
TGATGAAACTTACAACACATTTAAGCAAATTGGGAAATTAACGCATCATGATA
AGCAGGCTGAACAACCTTGTGAGGAACTAAAGATAATATCGATAAAGTCAT
AGATTCAATTCCTGCTCATCATAAAAAATCAAAGTATTTATTGAGGTTTCATC
AAAGCCTGAAATATATACAGCAGGGAAGCATACATTTTTCAATGATATGTTAG
AAAAATTAGAAGCCCAAATGTTTATAGTGACATTAATGGTTGGAACCCTGTA
ACGAAGGAAAGTATTATTAAGAAGAACCCAGATATATTAATTCGACGGAAG
CTAAGACAAGATCAGATTATATGGATATCATCAAAAAAGAGGTGGATTCAA
TAAAATTAATGCTGTCAAGAATACACGTATTGAAGTTGTAATGGTGATGAAG
TGCAAGACCAGGTCCACGTATTGATGAAGGATTAAGAATTAAGAGATGC
AATTTATAGAAAATAA
(SEQ ID NO:485)

FIG. 140

GTGAAGAAATCGTTAATTGCTTTTATTTTGATTTTATGCTTGTTCTGAGTGCC
TGTGGTATGAAAGATAATGATAAACAAGGTAGCGATGATAATGGCTCGTCTA
AATCGCCGTACCATAGAATTGTTTCGTTAATGCCTAGTAATACTGAAATTTTAT
ATGAATTAGGATTAGGTAAATACATAGTTGGTGTTC AACGGTTGATGATTAT
CCAAAAGATGTGAAAAAGGGTAAGAAACAATTTGATGCTTTGAATCTAAATA
AAGAGGAACTTTTAAAGGCAAAGCCAGATCTAATTCCTTGCGCATGAGTCGCAA
AAGGCAACTGCTAATAAAGTATTGTTCATCATTAGAGAAACAAGGCATCAAAG
TAGTGTATATTAAGATGCACAATCAATTGATGAAACTTACAACACATTTAAG
CAAATTGGGAAATTAACGCATCATGATAAGCAGGCTGAACAACCTTGTGAGG
AAACTAAAGATAATATCGATAAAGTCATAGATTCAATTCCTGCTCATCATAAA

77/112

AAATCAAAAAGTATTTATTGAGGTTTCATCAAAGCCTGAAATATATACAGCAGG
GAAGCATAACATTTTTCAATGATATGTTAGAAAAATTAGAAGCCCAAAATGTTT
ATAGTGACATTAATGGTTGGAACCCTGTAACGAAGGAAAGTATTATTAATAAAA
GAACCCAGATATATTAATTTTCGACGGAAGCTAAGACAAGATCAGATTATATGG
ATATCATCAAAAAAAGAGGTGGATTCAATAAAAATTAATGCTGTCAAGAATAC
ACGTATTGAAGTAGTAAATGGTGATGAAGTATCAAGACCAGGTCCACGTATTG
ATGAAGGATTAATAAGAATTAAGAGATGCAATTTATAGAAAATAA
(SEQ ID NO:486)

FIG. 141

GTGAAGAAATCGTTAATTGCTTTTATTTTGATTTTTATGCTTGTCTGAGTGGC
TGTGGTATGAAAGATAATGATAAACAAGGTAGCGATGATAATGGCTCGTCTA
AATCGCCGTACCATAGAATTGTTTCGTTAATGCCTAGTAATACTGAAATTTTAT
ATGAATTAGGATTAGGTAAATACATAGTTGGTGTTTCAACGGTTGATGATTAT
CCAAAAGATGTGAAAGAGGGTAAGAAACAATTTGATGCTTTGAATCTAAATA
AAGAGGAACTTTTAAAGGCAAAGCCAGATCTAATCCTTGCGCATGAGTCGCAA
AAGGCAACTGCTAATAAAGTATTGTCATCATTAGAGAAACAAGGCATCAAAG
TAGTGTATGTTAAAGATGCACAATCAATTGATGAAACATACAACACATTTAAG
CAAATTGGGAAATTAACGCATCATGATAAGCAGGCTGAACAACCTGTTGAGG
AAACTAAAGATAATATCGATAAAGTCATAGATTCAATTCCTGCTCATCATAAA
AAATCAAAAAGTATTTATTGAGGTTTCATCAAAGCCTGAAATATATACAGCAGG
GAAGCATAACATTTTTAATGATATGTTAGAAAAATTAGAAGCCCAAAATGTTT
ATAGTGACATTAATGGTTGGAACCCTGTAACGAAGGAAAGTATTATTAATAAAA
GAACCCAGATATATTAATTTTCGACGGAAGCTAAGACAAGATCAGATTATATGG
ATATCATCAAAAAAAGGGGTGGATTCAATAAAAATTAATGCTGTCAAGAATAC
ACGTATTGAAGTTGTAATGGTGATGAAGTATCAAGACCAGGTCCACGTATTG
ATGAAGGATTAATAAGAATTAAGAGATGCAATTTATAGAAAATAA
(SEQ ID NO:487)

FIG. 142

GTGAAGAAATCGTTAATTGCTTTTATTTTGATTTTTATGCTTGTCTGAGTGGC
TGTGGTATGAAAGATAATGATAAACAAGGTAGCGACGATAATGGCTCGTCTA
AATCGCCGTACCATAGAATTGTTTCGTTAATGCCTAGTAATACTGAAATTTTAT
ATGAATTAGGATTAGGTAAATACATAGTTGGTGTTTCAACGGTTGATGATTAT

78/112

CCAAAAGATGTGAAAAAGGGTAAGAAACAATTTGATGCTTTGAATCTAAATA
AAGAGGAACTTTTAAAGGCAAAGCCAGATCTAATTCTTGCGCATGAGTCGCAA
AAGGCAACTGCTAATAAAGTATTGTCATCATTAGAGAAACAAGGCATCAAAG
TAGTGTATGTTAAAGATGCACAATCAATTGATGAAACTTACAACACATTTAAG
CAAATTGGGAAATTAACGCATCATGAAAAGCAGGCTGAACAACCTGTTGAGG
AAACTAAGGATAATATCGATAAAGTCATAGATTCAATTCCTGCTCATCATAAA
AAATCAAAAAGTATTTATTGAGGTTTCATCAAAGCCTGAAATATATACAGCAGG
GAAGCATAACATTTTCAATGATATGTTAGAAAAATTAGAAGCCCAAATGTTT
ATAGTGACATTAATGGTTGGAACCCCTGTAACGAAGGAAAGTATTATTAATAA
GAACCCAGATATATTAATTCGACGGAAGCTAAGACAAGATCAGATTATATGG
ATATCATCAAAAAAAGAGGGTGGATTCAATAAAATTAATGCTGTCAAGAATAC
ACGTATTGAAGTTGTAATGGTGATGAAGTATCAAGACCCGGTCCACGTATTG
ATGAAGGATTAAGAATTAAGAGATGCAATTTATAGAAAATAA
(SEQ ID NO:488)

FIG. 143

GTGAAGAAATCGTTAATTGCTTTTATTTGATTTTATGCTTGTCTGAGTGGC
TGTGGTATGAAAGATAATGATAAACAAGGTAGCAATGATAATGGCTCGTCTA
AATCGCCGTACCATAGAATTGTTTCGTTAATGCCTAGTAATACTGAAATTTTAT
ATGAATTAGGATTAGGTAAATACATAGTTGGTGTTC AACGGTTGATGATTAT
CCAAAAGATGTGAAAGAGGGTAAGAAACAATTTGATGCTTTGAATCTAAATA
AAGAGGAACTTTTAAAGGAAAAGCCAGATCTAATTCTTGCGCATGAGTCGCA
AAAGGCAACTGCTAATAAAGTATTGTCATCATTAGAGAAACAAGGCATCAA
GTAGTGTATGTTAAAGATGCACAATCAATTGATGAAACATACAACACATTTAA
GCAAATTGGGAAATTAACGCATCATGATAAGCAGGCTGAACAACCTGTTGAG
GAAACTAAAGATAATATCGATAAAGTCATAGATTCAATTCCTGCTCATCATAA
AAAATCAAAAAGTATTTATTGAGGTTTCATCAAAGCCTGAAATATATACAGCAG
GAAAGCATAACATTTTCAATGATATGTTAGAAAAATTAGAAGCCCAAATGTT
TATAGTGACATTAATGGTTGGAACCCCTGTAACGAAGGAAAGTATTATTAATAA
GAACCCAGATATATTAATTCGACGGAAGCTAAGACAAGATCAGATTATATGG
ATATCATCAAAAAAAGAGGGTGGATTCAATAAAATTAATGCTGTCAAGAATAC
ACGTATTGAAGTTGTAATGGTGATGAAGTATCAAGACCCGGTCCACGTATTG
ATGAAGGATTAAGAATTAAGAGATGCAATTTATAGAAAATAA
(SEQ ID NO:489)

FIG. 144

GTGAAGAAATCGTTAATTGCTTTTATTTTGATTTTTATGCTTGTCCCTGAGTGGC
TGTGGTATGAAAGATAATGATAAACAAGGTAGCAATGATAATGGCTCGTCTA
AATCGCCGTACCATAGAATTGTTTCGTTAATGCCTAGTAATACTGAAATTTTAT
ATGAATTAGGATTAGGTAAATACATAGTTGGTGTTC AACGGTTGATGATTAT
CCAAAAGATGTGAAAAAGGGTAAGAAACAATTTGATGCTTTGAATCTAAATA
AAGAGGAACTTTTAAAGGCAAAGCCAGATCTAATTCTTGCGCATGAGTCGCAA
AAGGCAACTGCTAATAAAGTATTGTCATCATTAGAGAAACAAGGCATCAAAG
TAGTGTATGTTAAAGATGCACAATCAATTGATGAAACTTACAACACATTTAAG
CAAATTGGGAAATTAACGCATCATGATAAGCAGGCTGAACAACCTGTTGAGG
AAACTAAAGATAATATCGATAAAGTCATAGATTCAATTCCTGCTCATCATAAA
AAATCAAAGTATTTATTGAGGTTTCATCAAAGCCTGAAATATATACAGCAGG
GAAGCATAACATTTTTTAATGATATGTTAGAAAAATTAGAAGCCCAAATGTGT
ATAGTGACATTAATGGTTGGAACCCCTGTAACGAAGGAAAGTATTATTA AAAA
GAACCCAGATATATTAATTTTCGACGGAAGCTAAGACAAGATCAGATTATATGG
ATATCATCAAAAAAAGAGGTGGATTCAATAAAAATTAATGCTGTCAAGAATAC
ACGTATTGAAGTTGTAATGGTGATGAAGTATCAAGACCAGGTCCACGTATTG
ATGAAGGATTA AAAAGAATTAAGAGATGCAATTTATAGAAAATAA

(SEQ ID NO:490)

FIG. 145

GTGAAGAAATCGTTAATTGCTTTTATTTTGATTTTTATGCTTGTCCCTGAGTGGC
TGTGGTATGAAAGATAATGATAAACAAGGTAGCGATGATAATGGCTCGTCTA
AATCGCCGTACCATAGAATTGTTTCGTTAATGCCTAGTAATACTGAAATTTTAT
ATGAATTAGGATTAGGTAAATACATAGTTGGTGTTC AACGGTTGATGATTAT
CCAAAAGATGTGAAAGAGGGTAAGAAACAATTTGATGCTTTGAATCTAAATA
AAGAGGAACTTTTAAAGGCAAAGCCAGATCTAATTCTTGCGCATGAGTCGCAA
AAGGCAACTGCTAATAAAGTATTGTCATCATTAGAGAAACAAGGCATCAAAG
TAGTGTATGTTAAAGATGCACAATCAATTGATGAAACATACAACACATTTAAG
CAAATTGGGAAATTAACGCATCATGATAAGCAGGCTGAACAACCTGTTGAGG
AAACTAAAGATAATATCGATAAAGTCATAGATTCAATTCCTGCTCATCATAAA
AAATCAAAGTATTTATTGAGGTTTCATCAAAGCCTGAAATATATACAGCAGG
GAAGCATAACATTTTTTAATGATATGTTAGAAAAATTAGAAGCCCAAATGTTT

80/112

ATAGTGACATTAATGGTTGGAACCCTGTAACGAAGGAAAGTATTATTA
GAACCCAGATATATTAATTTTCGACGGAAGCTAAGACAAGATCAGATTATATGG
ATATCATCAAAAAAAGGGTGGATTCAATAAAATTAATGCTGTCAAGAATAC
ACGTATTGAAGTTGTAATGGTGATGAAGTATCAAGACCAGGTCCACGTATTG
ATGAAGGATTAAGAATTAAGAGATGCAATTTATAGAAAATAA
(SEQ ID NO:491)

FIG. 146

ATGAAAGATAATGATAACAAGGTAGCAATGATAATGGCTCGTCTAAATCGC
CGTACCATAGAATTGTTTCGTTAATGCCTAGTAATACTGAAATTTTATATGAAT
TAGGATTAGGTAAATACATAGTTGGTGTTCACCGTTGATGATTATCCAAA
GATGTGAAAAAGGGTAAGAAACAATTTGATGCTTTGAATCTAAATAAAGAGG
AACTTTTAAAGGCAAAGCCAGATCTAATTCCTTGCGCATGAGTCGCAAAGGCA
ACTGCTAATAAAGTATTGTCATCATTAGAGAAACAAGGCATCAAAGTAGTGTA
TGTTAAAGATGCACAATCAATTGATGAACTTACAACACATTTAAGCAAATTG
GGAAATTAACGCATCATGATAAGCAGGCTGAACAACCTTGTTGAGGAAACTAA
AGATAATATCGATAAAGTCATAGATTCAATTCCTGCTCATCATAAAAAATCAA
AAGTATTTATTGAGGTTTCATCAAAGCCTGAAATATATACAGCAGGGAAGCAT
ACATTTTTTAATGATATGTTAGAAAAATTAGAAGCCCAAATGTGTATAGTGA
CATAATGGTTGGAACCCTGTAACGAAGGAAAGTATTATTAAGAACC
GATATATTAATTTTCGACGGAAGCTAAGACAAGATCAGATTATATGGATATCAT
CAAAAAAAGAGGTGGATTCAATAAAATTAATGCTGTCAAGAATACACGTATT
GAAGTTGTAATGGTGATGAAGTATCAAGACCAGGTCCACGTATTGATGAAG
GATTAAGAATTAAGAGATGCAATTTATAGAAAATAA
(SEQ ID NO:492)

FIG. 147

GTGAAGAAATCGTTAATTGCTTTTATTTTGATTTTATGCTTGTCTGAGTGGC
TGTGGTATGAAAGATAATGATAACAAGGTAGCAATGATAATGGCTCGTCTA
AATCGCCGTACCATAGAATTGTTTCGTTAATGCCTAGTAATACTGAAATTTTAT
ATGAATTAGGATTAGGTAAATACATAGTTGGTGTTCACCGTTGATGATTAT
CCAAAAGATGTGAAAAAGGGTAAGAAACAATTTGATGCTTTGAATCTAAATA
AAGAGGAACTTTTAAAGGCAAAGCCAGATCTAATTCCTTGCGCATGAGTCGCAA
AAGGCAACTGCTAATAAAGTATTGTCATCATTAGAGAAACAAGGCATCAAAG

TAGTGTATGTTAAAGATGCACAATCAATTGATGAACTTACAACACATTTAAG
CAAATTGGGAAATTAACGCATCATGATAAGCAGGCTGAACAACCTGTTGAGG
AAACTAAAGATAATATCGATAAAGTCATAGATTCAATTCCTGCTCATCATAAA
AAATCAAAAAGTATTTATTGAGGTTTCATCAAAGCCTGAAATATATACAGCAGG
GAAGCATACATTTTTTAATGATATGTTAGAAAAATTAGAAGCCCAAAATGTGT
ATAGTGACATTAATGGTTGGAACCCTGTAACGAAGGAAAGTATTATTA AAAA
GAACCCAGATATATTAATTTTCGACGGAAGCTAAGACAAGATCAGATTATATGG
ATATCATCAAAAAAAGAGGTGGATTCAATAAAAATTAATGCTGTCAAGAATAC
ACGTATTGAAGTTGTAATGGTGATGAAGTATCAAGACCAGGTCCACGTATTG
ATGAAGGATTA AAAAGAATTAAGAGATGCAATTTATAGAAAATAA

(SEQ ID NO:493)

FIG. 148

ATGAAAGATAATGATAAACAAGGTAGCAATGATAATGGCTCGTCTAAATCGC
CGTACCATAGAATTGTTTCGTTAATGCCTAGTAATACTGAAATTTTATATGAAT
TAGGATTAGGTAAATACATAGTTGGTGTTC AACGGTTGATGATTATCCAAA
GATGTGAAAAAGGGTAAGAAACAATTTGATGCTTTGAATCTAAATAAAGAGG
AACTTTTAAAGGCCAAAGCCAGATCTAATTCCTTGCGCATGAGTCGAAAAGGCA
ACTGCTAATAAAGTATTGTCATCATTAGAGAAACAAGGCATCAAAGTAGTGTA
TGTTAAAGATGCACAATCAATTGATGAACTTACAACACATTTAAGCAAATTG
GGAAATTAACGCATCATGATAAGCAGGCTGAACAACCTGTTGAGGAAACTAA
AGATAATATCGATAAAGTCATAGATTCAATTCCTGCTCATCATAAAAAATCAA
AAGTATTTATTGAGGTTTCATCAAAGCCTGAAATATATACAGCAGGGAAGCAT
ACATTTTTTAATGATATGTTAGAAAAATTAGAAGCCCAAAATGTGTATAGTGA
CATTAATGGTTGGAACCCTGTAACGAAGGAAAGTATTATTA AAAAAGAACCCA
GATATATTAATTTTCGACGGAAGCTAAGACAAGATCAGATTATATGGATATCAT
CAAAAAAAGAGGTGGATTCAATAAAAATTAATGCTGTCAAGAATACACGTATT
GAAGTTGTAATGGTGATGAAGTATCAAGACCAGGTCCACGTATTGATGAAG
GATTA AAAAGAATTAAGAGATGCAATTTATAGAAAATAA

(SEQ ID NO:494)

FIG. 149

GTGAAGAAATCGTTAATTGCTTTTATTTT GATTTTATGCTTGTCTGAGTGGC
TGTGGTATGAAAGATAATGATAAACAAGGTAGCAATGATAATGGCTCGTCTA

AATCGCCGTACCATAGAATTGTTTCGTTAATGCCTAGTAATACTGAAATTTTAT
ATGAATTAGGATTAGGTAAATACATAGTTGGTGTTCACCGTTGATGATTAT
CCAAAAGATGTGAAAAGAGGGTAAGAAACAATTTGATGCTTTGAATCTAAATA
AAGAGGAACTTTTAAAGGAAAAGCCAGATCTAATTCTTGCGCATGAGTCGCA
AAAGGCAACTGCTAATAAAGTATTGTTCATCATTAGAGAAAACAAGGCATCAAA
GTAGTGTATGTTAAAGATGCACAATCAATTGATGAAACATACAACACATTTAA
GCAAATTGGGAAATTAACGCATCATGATAAGCAGGCTGAACAACCTGTTGAG
GAAACTAAAGATAATATCGATAAAGTCATAGATTCAATTCCTGCTCATCATAA
AAAATCAAAGTATTTATTGAGGTTTCATCAAAGCCTGAAATATATACAGCAG
GAAAGCATAACATTTTCAATGATATGTTAGAAAAATTAGAAGCCAAAATGTT
TATAGTGACATTAATGGTTGGAACCTGTAAACGAAGGAAAGTATTATTA
GAACCCAGATATATTAATTCGACGGAAGCTAAGACAAGATCAGATTATATGG
ATATCATCAAAAAAAGAGGTGGATTCAATAAAATTAATGCTGTCAAGAATAC
ACGTATTGAAGTTGTAATGGTGTGAAGTATCAAGACCCGGTCCACGTATTG
ATGAAGGATTAAGAATTAAGAGATGCAATTTATAGAAAATAA

(SEQ ID NO:495)

FIG. 150

AGTGATAAGTCAAATGGCAAACCTAAAAGTAGTAACGACGAATTCATTTTATA
TGATATGGCTAAAATGTTGGTGGAGACAACGTCGATATTCATAGTATTGTAC
CTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGTTAAACCTAAAGATATTA
TAACTGACGCTGACGTTATTTATACAACGGATTAAATTTAGAGACTGGTAA
CGGTTGGTTGAAAAAGCCTTAGAACAGGCTGGTAAATCATTAAAAGATAAA
AAAGTTATCGCAGTATCAAAAAGATGTTAAACCTATCTATTTAAACGGTGAAGA
AGGCAACAAAGATAAACAAGATCCACACGCATGGTTAAGTTTAGATAACGGT
ATTAATACGTAAAAACAATTCAACAAACATTTATCGATAACGACAAAAAAC
ATAAAGCAGATTATGAAAAGCAAGGTAACAAATACATTGCTCAATTGGAAAA
ATTAATAATGACAGTAAAGACAAATTTAATGACATTCCAAAAGAACAACGT
GCCATGATTACAAGTGAAGGTGCCTTCAAGTACTTCTCAAACAATACGGTAT
TACACCAGGTTATATTTGGGAAATTAACACTGAAAAACAAGGTACACCAGAA
CAAATGAGACAAGCTATTGAGTTTGTAAAAAGCACAAATTAACACTTATT
AGTAGAAACAAGTGTGATAAGAAAGCAATGGAAAGTTTATCTGAAGAAACG
AAGAAAGATATCTTTGGTGAAGTGTACACAGATTCAATCGGTAAAGAAGGCA

CTAAAGGTGACTCTTACTACAAAATGATGAAATCAAATATTGAAACTGTACAC
GGAAGCATGAAATAA

(SEQ ID NO:496)

FIG. 151

ATGAAAAAATTAGTACCTTTATTATTAGCCTTATTACTTCTAGTTGCTGCATGT
GGTACTGGTGGTAAACAAAGCAGTGATAAGTCAAATGGCAAATTTAAAAGTAG
TAACGACGAATTCAATTTTATATGATATGGCTAAAAATGTTGGTGGAGACAAC
GTCGATATTCATAGTATTGTACCTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGTT
AAACCTAAAGATATTA AAAAGTTAACTGACGCTGACGTTATTTTATAACAACGG
ATTA AATTTAGAGACTGGTAACGGTTGGTTTGAAAAAGCCTTAGAACAGGCTG
GTAAATCATTAAAAGATAAAAAAGTTATCGCAGTATCAAAGATGTAAACCT
ATCTATTTAAACGGTGAAGAAGGCAACAAAGATAAACAAGATCCACACGCAT
GGTTAAGTTTAGATAACGGTATTAAATACGTAAAAACAATTCAACAAACATTT
ATCGATAACGACAAAAACATAAAGCAGATTATGAAAAGCAAGGTAACA AAT
ACATTGCTCAATTGGAAAAATTAATAATGACAGTAAAGACAAATTTAATGAC
ATTCCAAAAGAACAACGTGCCATGATTACAAGTGAAGGTGCCTTCAAGTACTT
CTCAAAAACAATACGGTATTACACCAGGTTATATTTGGGAAATTAACACTGAAA
AACAAAGGTACACCAGAACA AATGAGACAAGCTATTGAGTTTGTTAAAAGCA
CAAATTA AACACTTATTAGTAGAAACAAGTGTTGATAAGAAAGCAATGGAA
AGTTTATCTGAAGAAACGAAGAAAGATATCTTTGGTGAAGTGTACACAGATTC
AATCGGTAAAGAAGGCACTAAAGGTGACTCTTACTACAAAATGATGAAATCA
AATATTGAAACTGTACACGGAAGCATGAAATAA

(SEQ ID NO:497)

FIG. 152

ATGAAAAAATTAGTACCTTTATTATTAGCCTTATTACTTCTAGTTGCTGCATGT
GGTACTGGTGGTAAACAAAGCAGTGATAAGTCAAATGGCAAATTTAAAAGTAG
TAACGACGAATTCAATTTTATATGATATGGCTAAAAATGTTGGTGGAGACAAC
GTCGATATTCATAGTATTGTACCTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGTT
AAACCTAAAGATATTA AAAAGTTAACTGACGCTGACGTTATTTTATAACAACGG
ATTA AATTTAGAGACTGGTAACGGTTGGTTTGAAAAAGCCTTAGAACAGGCTG
GTAAATCATTAAAAGATAAAAAAGTTATCGCAGTATCAAAGATGTAAACCT
ATCTATTTAAACGGTGAAGAAGGCAACAAAGATAAACAAGATCCACACGCAT

GGTTAAGTTTAGATAATGGTATTAAATACGTAAAAACAATTCAACAAACATTT
ATCGATAACGACAAAAACATAAAGCAGATTATGAAAAGCAAGGTAACAAAT
ACATTGCTCAATTGGAAAAATTAATAATGACAGTAAAGACAAATTTAATGAC
ATTCCAAAAGAACAACGTGCCATGATTACAAGTGAAGGTGCCTTCAAGTACTT
CTCAAAACAATACGGTATTACACCAGGTTATATTTGGGAAATTAACACTGAAA
AAACAAGGTACACCTGAACAAATGAGACAAGCTATTGAGTTTGTTAAAAAGCA
CAAATTA AACACTTATTAGTAGAAACAAGTGTTGATAAGAAAGCAATGGAA
AGTTTATCTGAAGAAACGAAGAAAGATATCTTTGGTGAAGTGTACACAGATTC
AATCGGTAAAGAAGGCACTAAAGGTGACTCTTACTACAAAATGATGAAATCA
AATATTGAAACTGTACACGGAAGCATGAAATAA

(SEQ ID NO:498)

FIG. 153

ATGAAAAAATTAGTACCTTTATTATTAGCCTTATTACTTTTAGTTGCTGCATGT
GGTACTGGTGGTAAACAAAGCAGTGATAAGTCAAATGGCAAACATAAAGTAG
TAACGACGAATTCAATTTTATATGATATGGCTAAAAATGTTGGTGGAGACAAC
GTCGATATTCATAGTATTGTACCTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGTT
AAACCTAAAGATATTA AAAAGTTAACTGACGCTGACGTTATTTTATACAACGG
ATTAAATTTAGAGACTGGTAACGGTTGGTTTGAAAAAGCCTTAGAACAGGCTG
GTAAATCATTAAAAGATAAAAAAGTTATCGCAGTATCAAAGATGTTAAACCT
ATCTATTTAAACGGTGAAGAAGGCAACAAAGATAAACAAGATCCACACGCAT
GGTTAAGTTTAGATAACGGTATTAAATACGTAAAAACAATTCAACAAACATTT
ATCGATAACGACAAAAACATAAAGCAGATTATGAAAAGCAAGGTAACAAAT
ACATTGCTCAATTGGAAAAATTAATAACGACAGTAAAGACAAATTTAATGA
CATTCCAAAAGAACAACGTGCCATGATTACAAGTGAAGGTGCCTTCAAGTACT
TCTCAAAACAATACGGTATTACACCAGGTTATATTTGGGAAATTAACACTGAA
AAACAAGGTACACCAGAACAATGAGACAAGCTATTGAGTTTGTTAAAAAGC
ACAAATTA AACACTTATTAGTAGAAACAAGTGTTGATAAGAAAGCAATGGA
AAGTTTATCTGAAGAAACGAAGAAAGATATCTTTGGTGAAGTGTACACAGATT
CAATCGGTAAAGAAGGCACTAAAGGTGACTCTTACTACAAAATGATGAAATC
AAATATTGAAACTGTACACGGAAGCATGAAATAA

(SEQ ID NO:499)

FIG. 154

ATGAAAAAATTAGTACCTTTATTATTAGCCTTATTACTTCTAGTTGCTGCATGT
GGTACTGGTGGTAAACAAAGCAGTGATAAGTCAAATGGCAAATTTAAAAGTAG
TAACGACGAATTCAATTTTATATGATATGGCTAAAAATGTTGGTGGAGACAAC
GTCGATATTCATAGTATTGTACCTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGTT
AAACCTAAAGATATTTAAAAGTTAACTGACGCTGACGTTATTTTATAACAACGG
ATTAATTTAGAGACTGGTAACGGTTGGTTTGAAAAAGCCTTAGAACAGGCTG
GTAAATCATTAAAAGATAAAAAAGTTATCGCAGTATCAAAGATGTTAAACCT
ATCTATTTAAACGGTGAAGAAGGCAACAAAGATAAACAAGATCCACACGCAT
GGTTAAGTTTAGATAACGGTATTAATAACGTAAAAACAATTCAACAAACATTT
ATCGATAACGACAAAAACATAAAGCAGATTATGAAAAGCAAGGTAACAAAT
ACATTGCTCAATTGGAAAAATTAATAATGACAGTAAAGACAAATTTAATGAC
ATTCCAAAAGAACAACGTGCCATGATTACAAGTGAAGGTGCCTTCAAGTACTT
CTCAAAACAATACGGTATTACACCAGGTTATATTTGGGAAATTAACACTGAAA
AACAAAGGTACACCTGAACAAATGAGACAAGCTATTGAGTTTGTTAAAAAGCA
CAAATTTAAACACTTATTAGTAGAAACAAGTGTGATAAGAAAGCAATGGAA
AGTTTATCTGAAGAAACGAAGAAAGATATCTTTGGTGAAGTGTACACAGATTC
AATCGGTAAAGAAGGCACTAAAGGTGACTCTTACTACAAAATGATGAAATCA
AATATTGAAACTGTACACGGAAGCATGAAATAA

(SEQ ID NO:500)

FIG. 155

ATGAAAAAATTAGTACCTTTATTATTAGCCTTATTACTTCTAGTTGCTGCATGT
GGTACTGGTGGTAAACAAAGCAGTGATAAGTCAAATGGCAAATTTAAAAGTAG
TAACGACGAATTCAATTTTATATGATATGGCTAAAAATGTTGGTGGAGACAAC
GTCGATATTCATAGTATTGTACCTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGTT
AAACCTAAAGATATTTAAAAGTTAACTGACGCTGACGTTATTTTATAACAACGG
ATTAATTTAGAGACTGGTAACGGTTGGTTTGAAAAAGCCTTAGAACAGGCTG
GTAAATCATTAAAAGATAAAAAAGTTATCGCAGTATCAAAGATGTTAAACCT
ATCTATTTAAACGGTGAAGAAGGCAACAAAGATAAACAAGATCCACACGCAT
GGTTAAGTTTAGATAACGGTATTAATAACGTAAAAACAATTCAACAAACATTT
ATCGATAACGACAAAAACATAAAGCAGATTATGAAAAGCAAGGTAACAAAT
ACATTGCTCAATTGGAAAAATTAATAATGACAGTAAAGACAAATTTAATGAC
ATTCCAAAAGAACAACGTGCCATGATTACAAGTGAAGGTGCCTTCAAGTACTT

86/112

CTCAAAACAATACGGTATTACACCAGGTTATATTTGGGAAATTAACACTGAAA
AACAAAGGTACACCTGAACAAATGAGACAAGCTATTGAGTTTGTAAAAAGCA
CAAATTAACACTTATTAGTAGAAACAAGTGTTGATAAGAAAGCAATGGAA
AGTTTATCTGAAGAAACGAAGAAAGATATCTTTGGTGAAGTGTACACAGATTC
AATCGGTAAAGAAGGCACTAAAGGTGACTCTTACTACAAAATGATGAAATCA
AATATTGAAACTGTACACGGAAGCATGAAATAA

(SEQ ID NO:501)

FIG. 156

ATGAAAAAATTAGTACCTTTATTATTAGCCTTATTACTTCTAGTTGCTGCATGT
GGTACTGGTGGTAAACAAAGCAGTGATAAGTCAAATGGCAAATTAAGTAG
TAACGACGAATTCAATTTTATATGATATGGCTAAAAATGTTGGTGGAGACAAC
GTCGATATTCATAGTATTGTACCTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGT
AAACCTAAAGATATTAAGTTAACTGACGCTGACGTTATTTATACAACGG
ATTAATTTAGAGACTGGTAACGGTTGGTTTGAAAAAGCCTTAGAACAGGCTG
GTAAATCATTAAAGATAAAAAAGTTATCGCAGTATCAAAGATGTTAAACCT
ATCTATTTAAACGGTGAAGAAGGCAACAAAGATAAACAAGATCCACACGCAT
GGTTAAGTTTAGATAAATGGTATTAAATACGTAAAAACAATTCAACAAACATTT
ATCGATAACGACAAAAACATAAAGCAGATTATGAAAAGCAAGGTAACAAAT
ACATTGCTCAATTGGAAAAATTAATAATGACAGTAAAGACAAATTTAATGAC
ATTCAAAAGAACAACGTGCCATGATTACAAGTGAAGGTGCCTTCAAGTACTT
CTCAAAACAATACGGTATTACACCAGGTTATATTTGGGAAATTAACACTGAAA
AACAAAGGTACACCTGAACAAATGAGACAAGCTATTGAGTTTGTAAAAAGCA
CAAATTAACACTTATTAGTAGAAACAAGTGTTGATAAGAAAGCAATGGAA
AGTTTATCTGAAGAAACGAAGAAAGATATCTTTGGTGAAGTGTACACAGATTC
AATCGGTAAAGAAGGCACTAAAGGTGACTCTTACTACAAAATGATGAAATCA
AATATTGAAACTGTACACGGAAGCATGAAATAA

(SEQ ID NO:502)

FIG. 157

ATGAAAAAATTAGTACCTTTATTATTAGCCTTATTACTTCTAGTTGCTGCATGT
GGTACTGGTGGTAAACAAAGCAGTGATAAGTCAAATGGCAAATTAAGTAG
TAACGACGAATTCAATTTTATATGATATGGCTAAAAATGTTGGTGGAGACAAC
GTCGATATTCATAGTATTGTACCTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGTT

87/112

AAACCTAAAGATATTA AAAAGTTAACTGACGCTGACGTTATTTTATACAACGG
ATTAAATTTAGAGACTGGTAACGGTTGGTTTGAAAAAGCCTTAGAACAGGCTG
GTAAATCATTAAAAGATAAAAAAGTTATCGCAGTATCAAAAAGATGTTAAACCT
ATCTATTTAAACGGTGAAGAAGGCAACAAAGATAAACAAGATCCACACGCAT
GGTTAAGTTTAGATAACGGTATTAATAACGTAAAAACAATTCAACAAACATTT
ATCGATAACGACAAAAAACATAAAGCAGATTATGAAAAGCAAGGTAACAAAT
ACATTGCTCAATTGGAAAAATTAATAATGACAGTAAAGACAAATTTAATGAC
ATTCCAAAAGAACAACGTGCCATGATTACAAGTGAAGGTGCCTTCAAGTACTT
CTCAAAACAATACGGTATTACACCAGGTTATATTTGGGAAATTAACACTGAAA
ACAAGGTACACCTGAACAAATGAGACAAGCTATTGAGTTTGTTAAAAAGCA
CAAATTTAAACACTTATTAGTAGAAACAAGTGTTGATAAGAAAGCAATGGAA
AGTTTATCTGAAGAAACGAAGAAAGATATCTTTGGTGAAGTGTACACAGATTC
AATCGGTAAAGAAGGCACTAAAGGTGACTCTTACTACAAAATGATGAAATCA
AATATTGAAACTGTACACGGAAGCATGAAATAA

(SEQ ID NO:503)

FIG. 158

ATGAAAAAATTAGTACCTTTATTATTAGCCTTATTACTTCTAGTTGCTGCATGT
GGTACTGGTGGTAAACAAAGCAGTGATAAGTCAAATGGCAAATTTAAAAGTAG
TAACGACGAATTCATTTTATATGATATGGCTAAAAATGTTGGTGGAGACAAC
GTCGATATTCATAGTATTGTACCTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGTT
AAACCTAAAGATATTA AAAAGTTAACTGACGCTGACGTTATTTTATACAACGG
ATTAAATTTAGAGACTGGTAACGGTTGGTTTGAAAAAGCCTTAGAACAGGCTG
GTAAATCATTAAAAGATAAAAAAGTTATCGCAGTATCAAAAAGATGTTAAACCT
ATCTATTTAAACGGTGAAGAAGGCAACAAAGATAAACAAGATCCACACGCAT
GGTTAAGTTTAGATAACGGTATTAATAACGTAAAAACAATTCAACAAACATTT
ATCGATAACGACAAAAAACATAAAGCAGATTATGAAAAGCAAGGTAACAAAT
ACATTGCTCAATTGGAAAAATTAATAATGACAGTAAAGACAAATTTAATGAC
ATTCCAAAAGAACAACGTGCCATGATTACAAGTGAAGGTGCCTTCAAGTACTT
CTCAAAACAATACGGTATTACACCAGGTTATATTTGGGAAATTAACACTGAAA
ACAAGGTACACCTGAACAAATGAGACAAGCTATTGAGTTTGTTAAAAAGCA
CAAATTTAAACACTTATTAGTAGAAACAAGTGTTGATAAGAAAGCAATGGAA
AGTTTATCTGAAGAAACGAAGAAAGATATCTTTGGTGAAGTGTACACAGATTC

AATCGGTAAAGAAGGCACTAAAGGTGACTCTTACTACAAAATGATGAAATCA
AATATTGAAACTGTACACGGAAGCATGAAATAA
(SEQ ID NO:504)

FIG. 159

ATGAAAAAATTAGTACCTTTATTATTAGCCTTATTACTTCTAGTTGCTGCATGT
GGTACTGGTGGTAAACAAAGCAGTGATAAGTCAAATGGCAAATTTAAAAGTAG
TAACGACGAATTCAATTTTATATGATATGGCTAAAAATGTTGGTGGAGACAAC
GTCGATATTCATAGTATTGTACCTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGTT
AAACCTAAAGATATTA AAAAGTTAACTGACGCTGACGTTATTTTATACAACGG
ATTA AATTTAGAGACTGGTAACGGTTGGTTTGAAAAAGCCTTAGAACAGGCTG
GTAAATCATTAAAAGATAAAAAAGTTATCGCAGTATCAAAGATGTTAAACCT
ATCTATTTAAACGGTGAAGAAGGCAACAAAGATAAACAAGATCCACACGCAT
GGTTAAGTTTAGATAACGGTATTAATACGTAAAAACAATTCAACAAACATTT
ATCGATAACGACAAAAACATAAAGCAGATTATGAAAAGCAAGGTAACAAAT
ACATTGCTCAATTGGAAAAATTAATAATGACAGTAAAGACAGTAAAGACAA
ATTTAATGACATTCCAAAAGAACAACGTGCCATGATTACAAGTGAAGGTGCCT
TCAAGTACTTCTCAAACAATACGGTATTACACCAGGTTATATTTGGGAAATT
AACACTGAAAAACAAGGTACACCTGAACAAATGAGACAAGCTATTGAGTTTG
TAAAAAGCACAAATTA AACACTTATTAGTAGAAACAAGTGTTGATAAGAA
AGCAATGGAAAGTTTATCTGAAGAAACGAAGAAAGATATCTTTGGTGAAGTG
TACACAGATTCAATCGGTAAAGAAGGCACTAAAGGTGACTCTTACTACAAAAT
GATGAAATCAAATATTGAAACTGTACACGGAAGCATGAAATAA
(SEQ ID NO:505)

FIG. 160

ATGAAAAAATTAGTACCTTTATTATTAGCCTTATTACTTCTAGTTGCTGCATGT
GGTACTGGTGGTAAACAAAGCAGTGATAAGTCAAATGGCAAATTTAAAAGTAG
TAACGACGAATTCAATTTTATATGATATGGCTAAAAATGTTGGTGGAGACAAC
GTCGATATTCATAGTATTGTACCTGTTGGTCAAGATCCTCATGAATATGAAGTT
AAACCTAAAGATATTA AAAAGTTAACTGACGCTGACGTTATTTTATACAACGG
ATTA AATTTAGAGACTGGTAACGGTTGGTTTGAAAAAGCCTTAGAACAGGCTG
GTAAATCATTAAAAGATAAAAAAGTTATCGCAGTATCAAAGATGTTAAACCT
ATCTATTTAAACGGTGAAGAAGGCAACAAAGATAAACAAGATCCACACGCAT

89/112

GGTTAAGTTTAGATAACGGTATTAATACGTAAAAACAATTCAACAAACATTT
ATCGATAACGACAAAAACATAAAGCAGATTATGAAAAGCAAGGTAACAAAT
ACATTGCTCAATTGGAAAAATTAATAATGACAGTAAAGACAAATTTAATGAC
ATCCAAAAGAACAACGTGCCATGATTACAAGTGAAGGTGCCTTCAAGTACTT
CTCAAAACAATACGGTATTACACCAGGTTATATTTGGGAAATTAACACTGAAA
AACAAAGGTACACCTGAACAAATGAGACAAGCTATTGAGITTTGTTAAAAAGCA
CAAATTAACACTTATTAGTAGAAAACAAGTGTTGATAAGAAAAGCAATGGAA
AGTTTATCTGAAGAAACGAAGAAAGATATCTTTGGTGAAGTGTACACAGATTC
AATCGGTAAAGAAGGCACTAAAGGTGACTCTTACTACAAAATGATGAAATCA
AATATTGAAACTGTACACGGAAGCATGAAATAA

(SEQ ID NO:506)

FIG. 161A

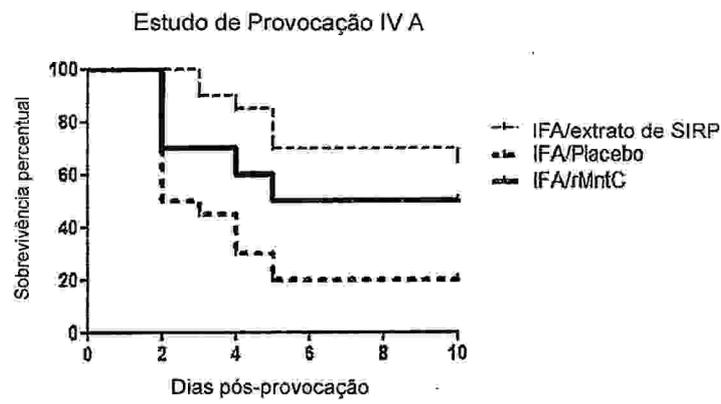


FIG. 161B

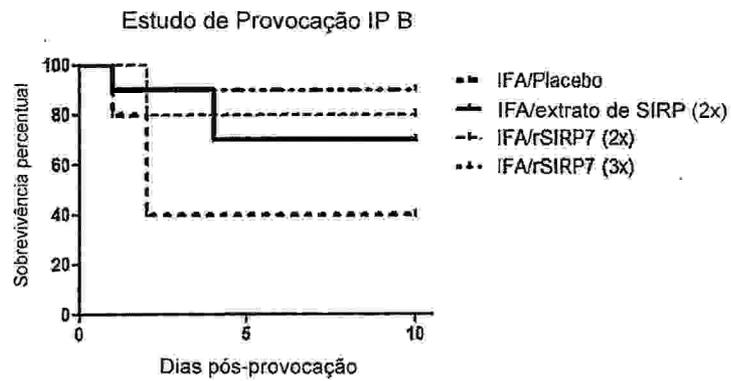


FIG. 161C

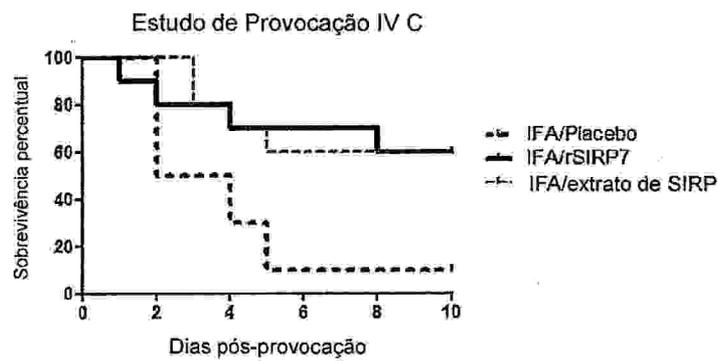


FIG. 162

MKKTVLYLVLA VMFLLAACGNSDKEQSKSETKGSKETV KIENNYKMRGEKKD
GSDAKKVKETVEVPKNPKNAVVDY GALDVMKEMGLSDKVKALPNFLESFKDD
KYTNIGNLKEVNFDKIAATKPEVIFISGRTANQKNLDEFKKAAPKAKIVYVGADE
KNLIGSMKQNTENIGKIYDKEVKAKELNKDLDNKIASMKDKTKNFNKTVMYLLV
NEGELSTFGPKGRFGGLVYDTLGFNAVDKKVSNSNHGQNSNEYVNKENPDVIL
AMDRGQAVSGKSTAKQALNNPVLKNVKAIKEDKVYNLDPKLWYFAAGSTTTTI
KQIEELDKVVK
(SEQ ID NO:543)

FIG. 163

MKKTVLYLVLA VMFLLAACGNSDKEQSKSETKGSKDTV KIENNYKMRGEKKD
GSDAKKVKETVEVPKNPKNAVVDY GALDVMKEMGLSDKVKALPKGEGGKSLP
NFLESFKDDKYTNVGNLKEVNFDKIAATKPEVIFISGRTANQKNLDEFKKAAPKA
KIVYVGADEKNLIGSMKQNTENIGKIYDKEDKAKELNKDLDNKIASMKDKTKNF
NKTVMYLLVNEGELSTFGPKGRFGGLVYDTLGFNAVDKKVSNSNHGQNSNEY
VNKENPDVILAMDRGQAISGKSTAKQALNNPVLKNVKAIKEDKVYNLDPKLWYF
AAGSTTTTIKQIEELDKVVK
(SEQ ID NO:544)

FIG. 164

MKKTVLYLVVA VMFLLAACGNSDKEQSKSETKGSKDTV KIENNYKMRGEKKD
GSDAKKVKETVEVPKNPKNAVVDY GALDVMKEMGLSDKVKALPKGEGGKSLP
NFLESFKDDKYTNVGNLKEVNFDKIAATKPEVIFISGRTANQKNLDEFKKAAPKA
KIVYVGADEKNLISSMKQNTENIGKIYDKEDKAKELNKDLDNKIASMKDKTKKF
NKSVMYLLVNEGELSTFGPKGRFGGLVYDTLGFNAVDKNVSNSNHGQNSNEYI
NKENPDVILAMDRGQAVSGKSTAKQALNNPVLKNVKAIKEDKVYNLDPKLWYF
AAGSTTTTIKQIDELEKVVK
(SEQ ID NO:545)

FIG. 165

MKKTVLYLVLA VMFLLAACGNSDKEQSKSETKGSKDTV KIENNYKMRGEKKD
GSDAKKVKETVEVPKNPKNAVVDY GALDVMKEMGLSDKVKALPKGEGGKSLP
NFLESFKDDKYTNVGNLKEVNFDKIAATKPEVIFISGRTANQKNLDEFKKAAPKA

KIVYVGADEKNLIGSMKQNTENIGKIYDKEDKAKELNKDLDNKIASMKDKTKNF
NKTVMYLLVNEGELSTFGPKGRFGGLVYDTLGFNAVDDKVSNSNHGQNSNEY
VNKENPDVILAMDRGQAISGKSTAKQALNNPVLKNVKAIKEDKVYNLDPKLWYF
AAGSTTTTIKQIEELDKVVK

(SEQ ID NO:546)

FIG. 166

MKKTVLVYLAVMFLLAACGNNSDKEQSKSETKGSKDTVKIENNYKMRGEKKD
GSDAKKVKETVEVPKNPKNAVVDYDYGALDVMKEMGLSDKVKALPKGEGGKSLP
NFLESFKDDKYTNVGNLKEVNFDKIAATKPEVIFISGRTANQKNLDEFKKAAPKA
KIVYVGADEKNLIGSMKQNTENIGKIYDKEDKAKELNKDLDNKIASMKDKTKNF
NKTVMYLLVNEGELSTFGPKGRFGGLVYDTLGFNAVDDKVSNSNHGQNSNEY
VNKENPDVILAMDRGQAISGKSTAKQALNNPVLKNVKAIKEDKVYNLDPKLWYF
AAGSTTTTIKQIEELDKVVK

(SEQ ID NO:547)

FIG. 167

MKKTVLVYLAVMFLLAACGNNSDKEQSKSETKGSKDTVKIENNYKMRGEKKD
GSDAKKVKETVEVPKNPKNAVVDYDYGALDVMKEMGLSDKVKALPKGEGGKSLP
NFLESFKDDKYTNVGNLKEVNFDKIAATKPEVIFISGRTANQKNLDEFKKAAPKA
KIVYVGADEKNLIGSMKQNTENIGKIYDKEDKAKELNKDLDNKIASMKDKTKNF
NKTVMYLLVNEGELSTFGPKGRFGGLVYDTLGFNAVDDKVSNSNHGQNSNEY
VNKENPDVILAMDRGQAISGKSTAKQALNNPVLKNVKAIKEDKVYNLDPKLWYF
AAGSTTTTIKQIEELDKVVK

(SEQ ID NO:548)

FIG. 168

MKKTVLVYLAVMFLLAACGNNSDKEQSKSETKGSKDTVKIENNYKMRGEKKD
GSDAKKVKETVEVPKNPKNAVVDYDYGALDVMKEMGLSDKVKALPKGEGGKSLP
NFLESFKDDKYTNVGNLKEVNFDKIAATKPEVIFISGRTANQKNLDEFKKAAPKA
KIVYVGADEKNLIGSMKQNTENIGKIYDKEDKAKELNKDLDNKIASMKDKTKNF
NKTVMYLLVNEGELSTFGPKGRFGGLVYDTLGFNAVDDKVSNSNHGQNSNEY
VNKENPDVILAMDRGQAISGKSTAKQALNNPVLKNVKAIKEDKVYNLDPKLWYF
AAGSTTTTIKQIEELDKVVK

(SEQ ID NO:549)

FIG. 169

MKKTVLVLA VMFLLAACGNSDKEQSKSETKGSKDTVKIENNYKMRGEKKD
GSDAKVKETVEVPKNPKNAVVL DYGALDVMKEMGLSDKVKALPKGEGGKSLP
NFLESFKDDKYTNVGNLKEVNFDKIAATKPEVIFISGRTANQKNLDEFKKAAPKA
KIVYVGADEKNLIGSMKQNTENIGKIYDKEDKAKELNKDLDNKIASMKDKTKNF
NKTVMYLLVNEGELSTFGPKGRFGGLVYDTLGFNAV DKKVSNSNHGQNVSN EY
VNKENPDVILAMDRGQAISGKSTAKQALNNPVLKNVKA IKEDKVYNLDPKLWYF
AAGSTTTTIKQIEELDKVVK

(SEQ ID NO:550)

FIG. 170

MKKTVLVLA VMFLLAACGNSDKEQSKSETKGSKDTVKIENNYKMRGEKKD
GSDAKVKETVEVPKNPKNAVVL DYGALDVMKEMGLSDKVKALPKGEGGKSLP
NFLESFKDDKYTNVGNLKEVNFDKIAATKPEVIFISGRTANQKNLDEFKKAAPKA
KIVYVGADEKNLIGSMKQNTENIGKIYDKEDKAKELNKDLDNKIASMKDKTKNF
NKTVMYLLVNEGELSTFGPKGRFGGLVYDTLGFNAV DKKVSNSNHGQNVSN EY
VNKENPDVILAMDRGQAISGKSTAKQALNNPVLKNVKA IKEDKVYNLDPKLWYF
AAGSTTTTIKQIEELDKVVK

(SEQ ID NO:551)

FIG. 171

MKKTVLVLA VMFLLAACGNSDKEQSKSETKGSKDTVKIENNYKMRGEKKD
GSDAKVKETVEVPKNPKNAVVL DYGALDVMKEMGLSDKVKALPKGEGGKSLP
NFLESFKDDKYTNVGNLKEVNFDKIAATKPEVIFISGRTANQKNLDEFKKAAPKA
KIVYVGADEKNLIGSMKQNTENIGKIYDKEDKAKELNKDLDNKIASMKDKTKNF
NKTVMYLLVNEGELSTFGPKGRFGGLVYDTLGFNAV DKKVSNSNHGQNVSN EY
VNKENPDVILAMDRGQAISGKSTAKQALNNPVLKNVKA IKEDKVYNLDPKLWYF
AAGSTTTTIKQIEELDKVVK

(SEQ ID NO:552)

FIG. 172

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE

94/112

ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNLKATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
(SEQ ID NO:553)

FIG. 173

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKS YKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNLKATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
(SEQ ID NO:554)

FIG. 174

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKS YKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDIEKVAKEKPDIIIV
YSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
TTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQPE
QQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNLKATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
(SEQ ID NO:555)

FIG. 175

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKS YKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNLKATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
(SEQ ID NO:556)

FIG. 176

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
(SEQ ID NO:557)

FIG. 177

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
(SEQ ID NO:558)

FIG. 178

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
(SEQ ID NO:559)

FIG. 179

MKKLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
(SEQ ID NO:560)

FIG. 180

MKLLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
 PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
 VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
 ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
 EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
 HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
 (SEQ ID NO:561)

FIG. 181

MKLLLLPLIIMLLVLAACGNQGEKNNKAETKSYKMDDGKTVDIPKDPKRIAVVA
 PTYAGGLKKLGANIVAVNQVDQSKVLKDKFKGVTKIGDGDVEKVAKEKPDII
 VYSTDKDIKKYQKVAPT VVVDYNKHKYLEQQEMLGKIVGKEDKVKA WKKDWE
 ETTAKDGKEIKKAIGQDATVSLFDEFDKKLYTYGDNWGRGGEVLYQAFGLKMQP
 EQQKLTAKAGWAEVKQEEIEKYAGDYIVSTSEGKPTPGYESTNMWKNL KATKEG
 HIVKVDAGTYWYNDPYTLDFMRKDLKEKLIKAAK
 (SEQ ID NO:562)

FIG. 182

ATGAAGAAAACAGTCTTATATTTAGTATTAGCAGTAATGTTTTTATTAGCGGC
 ATGCGGTAACAATTCTGATAAAGAACAATCAAAATCAGAACTAAAGGTTCA
 AAAGAAACGGTTAAAATTGAAAATAACTATAAAATGCGTGCGGAGAAAAAAG
 ATGGTAGTGACGCTAAAAAAGTTAAAGAACTGTTGAAGTACCAAAGAATCC
 TAAAAATGCAGTTGTGTTAGACTATGGCGCATTAGATGTAATGAAAGAAATGG
 GCTTATCAGACAAAGTAAAAGCATTACCGAATTTCTTAGAATCATTTAAAGAT
 GATAAATATACAAACATTGGTAATTTAAAAGAAGTGAATTTTGATAAAATTGC
 TGCGACGAAACCCGAAGTAATCTTTATCTCTGGACGTACAGCTAATCAAAAGA
 ATTTAGATGAATTCAAAAAAGCTGCACCTAAAGCGAAAATTGTTTATGTTGGT
 GCAGATGAAAAGA ACTTAATTGGTTCAATGAAACAAAACACTGAAAATATCG
 GTAAAATCTACGACAAAGAAGTCAAAGCTAAAGAGTTAAATAAAGATTTAGA
 TAATAAAATTGCTTCAATGAAAGATAAAACGAAAACTCAATAAAACTGTTA
 TGTATTTACTAGTTAACGAAGGTGAATTATCAACATTTGGACCTAAAGGTCGT
 TTTGGTGGATTAGTTTACGATACATTAGGATTCAATGCAGTTGATAAAAAAGT
 AAGTAATAGTAATCATGGACAAAATGTTTCTAACGAATATGTAAATAAAGAA

97/112

AATCCAGATGTTATTTAGCGATGGATAGAGGTCAAGCGGTAAGTGGTAAATC
AACTGCGAAACAAGCATTAAATAATCCTGTATTAATAAATGTTAAAGCAATTA
AAGAAGACAAAGTTTATAATTTAGATCCTAAATTATGGTACTTTGCAGCTGGA
TCAACTACAACATAAATAAACAATTGAGGAACTTGATAAAGTTGTAAAATA
A

(SEQ ID NO:563)

FIG. 183

ATGAAGAAAACAGTCTTATATTTAGTATTAGCAGTAATGTTTTTATTAGCGGC
ATGCGGTAACAATTCTGATAAAGAACAATCAAAATCAGAACTAAAGGTTCT
AAAGATACAGTAAAAATTGAAAATAACTATAAAATGCGTGGCGAGAAAAAAG
ATGGTAGTGACGCTAAAAAAGTTAAAGAACTGTTGAAGTACCAAAAAATCC
TAAAAATGCAGTTGTGTTAGACTATGGCGCATTAGATGTAATGAAAGAAATGG
GCTIATCAGATAAAGTAAAAGCATTACCTAAAGGGGAAGGCGGTAAGTCATT
ACCGAATTTCTTAGAATCATTAAAGATGATAAATATACAAACGTTGGTAATT
TAAAAGAAGTGAATTTTGATAAAATTGCTGCGACGAAACCCGAAGTAATCTTT
ATCTCTGGACGTACAGCTAATCAAAAGAATTTAGATGAATTCAAAAAGCTGC
ACCTAAAGCGAAAATTGTTTATGTTGGTGCAGATGAAAAGAAGCTTAATTGGTT
CAATGAAACAAAACACTGAAAATATCGGTAAAATTTACGATAAAGAAGATAA
AGCTAAAGAATTAATAAAGATTTAGATAACAAAATTGCTTCAATGAAAGAT
AAAACGAAAACCTTCAATAAAACTGTTATGTATTTACTAGTTAACGAAGGTGA
ATTATCAACATTTGGACCTAAAGGTCGTTTTGGTGGATTAGTTTACGATACATT
AGGATTC AATGCAGTTGATAAAAAAGTAAGTAATAGCAATCATGGACAAAAT
GTTTCTAACGAATATGTTAATAAAGAAAATCCAGATGTTATTTAGCGATGGA
TAGAGGTCAAGCGATAAGTGGTAAATCAACTGCGAAAACAAGCATTAAATAAT
CCTGTATTAATAAATGTTAAAGCAATTAAGAAGACAAAGTATATAATTTAGA
TCCTAAATTATGGTACTTTGCAGCTGGATCAACTACAACATAAATAAACA
TTGAGGAACTTGATAAAGTTGTAAAATAA

(SEQ ID NO:564)

FIG. 184

ATGAAGAAAACAGTCTTATATTTAGTAGTAGCAGTAATGTTTTTATTAGCGGC
ATGCGGTAACAATTCTGATAAAGAACAATCAAAATCAGAACTAAAGGTTCT
AAAGATACAGTAAAAATTGAAAACAACATAAAATGCGTGGCGAGAAAAAAG

98/112

ATGGTAGCGATGCTAAAAAAGTTAAAGAACTGTTGAAGTACCAAAGAACCC
TAAAAATGCAGTTGTATTAGATTATGGCGCATTAGATGTAATGAAAGAAATGG
GCTTATCAGACAAAGTAAAAGCATTACCTAAAGGTGAAGGCGGCAAGTCATT
ACCGAATTTCTTAGAGTCATTTAAAGATGACAAGTATACAAATGTTGGTAACT
TGAAAGAAGTTAATTTTCGATAAAATTGCAGCAACAAAACCGGAAGTAATCTTT
ATCTCTGGCCGTACAGCAAATCAAAGAATTTAGATGAATTTAAAAAAGCTGC
ACCAAAAGCAAAAATTGTTTACGTTGGTGCAGATGAAAAGAATTTAATTAGTT
CAATGAAACAAAACACTGAAAATATTGGTAAAATTTACGATAAAGAAGATAA
AGCTAAAGAATTAATAAAGATTTAGATAACAAAATTGCTTCAATGAAAGAT
AAAATAAGAAGTTCAACAAATCAGTTATGTATTTATTAGTTAATGAAGGTGA
ATTATCAACATTTGGACCTAAAGGTCGTTTCGGTGGATTAGTTTACGATACATT
AGGTTTCAACGCGGTTGATAAAAACGTAAGCAATAGTAACCACGGACAAAAT
GTCTCTAACGAATACATTAATAAAGAAAATCCAGATGTTATTTTAGCAATGGA
TAGAGGACAGGCTGTAAGTGGTAAATCAACTGCGAAACAAGCATTAAATAAT
CCTGTATTAATAAATGTTAAAGCAATTAAGAAGACAAAGTTTATAATTTAGA
CCCTAAATTATGGTACTTTGCAGCTGGATCAACTACAATAAATAAATAA
TTGATGAACTTGAAAAAGTTGTAAAATAA

(SEQ ID NO:565)

FIG. 185

ATGAAGAAAACAGTCTTATATTTAGTATTAGCAGTAATGTTTTTATTAGCGGC
ATGCGGTAACAATTCTGATAAAGAACAATCAAAATCAGAACTAAAGGTTCT
AAAGATACAGTAAAAATTGAAAATAACTATAAAATGCGTGGCGAGAAAAAAG
ATGGTAGTGACGCTAAAAAAGTTAAAGAACTGTTGAAGTACCAAATAATCC
TAAAAATGCAGTTGTGTTAGACTATGGCGCATTAGATGTAATGAAAGAAATGG
GCTTATCAGATAAAGTAAAAGCATTACCTAAAGGGGAAGGCGGTAAGTCATT
ACCGAATTTCTTAGAATCATTAAAGATGATAAATATACAAACGTTGGTAATT
TAAAAGAAGTGAATTTTGATAAAAATTGCTGCGACGAAACCCGAAGTAATCTTT
ATCTCTGGACGTACAGCTAATCAAAGAATTTAGATGAATTCAAAAAAGCTGC
ACCTAAAGCGAAAATTGTTTATGTTGGTGCAGATGAAAAGAACTTAATTGGTT
CAATGAAACAAAACACTGAAAATATCGGTAAAATTTACGATAAAGAAGATAA
AGCTAAAGAATTAATAAAGATTTAGATAACAAAATTGCTTCAATGAAAGAT
AAAACGAAAACCTCAATAAACTGTTATGTATTTACTAGTTAACGAAGGTGA
ATTATCAACATTTGGACCTAAAGGTCGTTTTGGTGGATTAGTTTACGATACATT

99/112

AGGATTCAATGCAGTTGATAAAAAAGTAAGTAATAGCAATCATGGACAAAAT
GTTTCTAACGAATATGTTAATAAAGAAAATCCAGATGTTATTTTAGCGATGGA
TAGAGGTCAAGCGATAAGTGGTAAATCAACTGCGAAACAAGCATTAAATAAT
CCTGTATTAAAAAATGTTAAAGCAATTAAGAAGACAAAGTATATAATTTAGA
TCCTAAATTATGGTACTTTGCAGCTGGATCAACTACAACATAATTAACAAA
TTGAGGAACCTTGATAAAGTTGTAATAA

(SEQ ID NO:566)

FIG. 186

ATGAAGAAAACAGTCTTATATTTAGTATTAGCAGTAATGTTTTATTAGCGGC
ATGCGGTAACAATTCTGATAAAGAACAATCAAAATCAGAACTAAAGGTTCT
AAAGATACAGTAAAAATTGAAAATAACTATAAAATGCGTGGCGAGAAAAAAG
ATGGTAGTGACGCTAAAAAAGTTAAAGAACTGTTGAAGTACCAAAAAATCC
TAAAAATGCAGTTGTGTTAGACTATGGCGCATTAGATGTAATGAAAGAAATGG
GCTTATCAGATAAAGTAAAAGCATTACCTAAAGGGGAAGGCGGTAAGTCATT
ACCGAATTTCTTAGAATCATTAAAGATGATAAATATACAAACGTTGGTAATT
TAAAAGAAGTGAATTTTGATAAAATTGCTGCGACGAAACCCGAAGTAATCTTT
ATCTCTGGACGTACAGCTAATCAAAAGAATTTAGATGAATTCAAAAAGCTGC
ACCTAAAGCGAAAATTGTTTATGTTGGTGCAGATGAAAAGAAGCTTAATTGGTT
CAATGAAACAAAACACTGAAAATATCGGAAAAATTTACGATAAAGAAGATAA
AGCTAAAGAATTAATAAAGATTTAGATAACAAAATTTGCTTCAATGAAAGAT
AAAACGAAAACCTTCAATAAACTGTTATGTATTTACTAGTTAACGAAGGTGA
ATTATCAACATTTGGACCTAAAGGTCGTTTTGGTGGATTAGTTTACGATACATT
AGGATTCAATGCAGTTGATAAAAAAGTAAGTAATAGCAATCATGGACAAAAT
GTTTCTAACGAATATGTTAATAAAGAAAATCCAGATGTTATTTTAGCGATGGA
TAGAGGTCAAGCGATAAGTGGTAAATCAACTGCGAAACAAGCATTAAATAAT
CCTGTATTAAAAAATGTTAAAGCAATTAAGAAGACAAAGTATATAATTTAGA
TCCTAAATTATGGTACTTTGCAGCTGGATCAACTACAACATAATTAACAAA
TTGAGGAACCTTGATAAAGTTGTAATAA

(SEQ ID NO:567)

FIG. 187

ATGAAGAAAACAGTCTTATATTTAGTATTAGCAGTAATGTTTTATTAGCGGC
ATGCGGTAACAATTCTGATAAAGAACAATCAAAATCAGAACTAAAGGTTCT

100/112

AAAGATACAGTAAAAATTGAAAATAACTATAAAATGCGTGGCGAGAAAAAAG
ATGGTAGTGACGCTAAAAAAGTTAAAGAACTGTTGAAGTACCAAAAAATCC
TAAAAATGCAGTTGTGTTAGACTATGGCGCATTAGATGTAATGAAAGAAATGG
GCTTATCAGATAAAGTAAAAGCATTACCTAAAGGGGAAGGCGGTAAGTCATT
ACCGAATTTCTTAGAATCATTTAAAGATGATAAATATACAAACGTTGGTAATT
TAAAAGAAGTGAATTTTGATAAAATTGCTGCGACGAAACCCGAAGTAATCTTT
ATCTCTGGACGTACAGCTAATCAAAGAATTTAGATGAATTCAAAAAAGCTGC
ACCTAAAGCGAAAATTGTTTATGTTGGTGCAGATGAAAAGAAGCTTAATTGGTT
CAATGAAACAAAACACTGAAAATATCGGTAAAATTTACGATAAAGAAGATAA
AGCTAAAGAATTAATAAAGATTTAGATAACAAAATTGCTTCAATGAAAGAT
AAAACGAAAAACTTCAATAAAACTGTTATGTATTTACTAGTTAACGAAGGTGA
ATTATCAACATTTGGACCTAAAGGTCGTTTTGGTGGATTAGTTIACGATACATT
AGGATTCAATGCAGTTGATAAAAAAGTAAGTAATAGCAATCATGGACAAAAT
GTTTCTAACGAATATGTTAATAAAGAAAATCCAGATGTTATTTTAGCGATGGA
TAGAGGTCAAGCGATAAGTGGTAAATCAACTGCGAAACAAGCATTAAATAAT
CCTGTATTAATAAATGTTAAAGCAATTAAGAAGACAAAGTATATAATTTAGA
TCCTAAATTATGGTACTTTGCAGCTGGATCAACTACAACATAATTAACAAA
TTGAGGAACCTTGATAAAGTTGTAATAA

(SEQ ID NO:568)

FIG. 188

ATGAAGAAAACAGTCTTATATTTAGTATTAGCAGTAATGTTTTTATTAGCGGC
ATGCGGTAACAATTCTGATAAAGAACAATCAAATCAGAACTAAAGGTTCT
AAAGATACAGTAAAAATTGAAAATAACTATAAAATGCGTGGCGAGAAAAAAG
ATGGTAGTGACGCTAAAAAAGTTAAAGAACTGTTGAAGTACCAAAAAATCC
TAAAAATGCAGTTGTGTTAGACTATGGCGCATTAGATGTAATGAAAGAAATGG
GCTTATCAGATAAAGTAAAAGCATTACCTAAAGGGGAAGGCGGTAAGTCATT
ACCGAATTTCTTAGAATCATTTAAAGATGATAAATATACAAACGTTGGTAATT
TAAAAGAAGTGAATTTTGATAAAATTGCTGCGACGAAACCCGAAGTAATCTTT
ATCTCTGGACGTACAGCTAATCAAAGAATTTAGATGAATTCAAAAAAGCTGC
ACCTAAAGCGAAAATTGTTTATGTTGGTGCAGATGAAAAGAAGCTTAATTGGTT
CAATGAAACAAAACACTGAAAATATCGGAAAAATTTACGATAAAGAAGATAA
AGCTAAAGAATTAATAAAGATTTAGATAACAAAATTGCTTCAATGAAAGAT
AAAACGAAAAACTTCAATAAAACTGTTATGTATTTACTAGTTAACGAAGGTGA

101/112

ATTATCAACATTTGGACCTAAAGGTCGTTTTGGTGGATTAGTTTACGATACATT
AGGATTCAATGCAGTTGATAAAAAAGTAAGTAATAGCAATCATGGACAAAAT
GTTTCTAACGAATATGTTAATAAAGAAAATCCAGATGTTATTTAGCGATGGA
TAGAGGTCAAGCGATAAGTGGTAAATCAACTGCGAAACAAGCATTAAATAAT
CCTGTATTA AAAAATGTTAAAGCAATTAAGAAGACAAAGTATATAATTTAGA
TCCTAAATTATGGTACTTTGCAGCTGGATCAACTACA ACTACAATTAACAAA
TTGAGGAACTTGATAAAGTTGTA AAAATAA
(SEQ ID NO:569)

FIG. 189

ATGAAGAAAACAGTCTTATATTTAGTATTAGCAGTAATGTTTTATTAGCGGC
ATGCGGTAACAATTCTGATAAAGAACAATCAAAATCAGAACTAAAGGTTCT
AAAGATACAGTAAAAATTGAAAATAACTATAAAATGCGTGGCGAGAAAAAAG
ATGGTAGTGACGCTAAAAAGTTAAAGAACTGTTGAAGTACCAAAAAATCC
TAAAAATGCAGTTGTGTTAGACTATGGCGCATTAGATGTAATGAAAGAAATGG
GCTTATCAGATAAAGTAAAAGCATTACCTAAAGGGGAAGGCGGTAAGTCATT
ACCGAATTTCTTAGAATCATTTAAAGATGATAAATATACAAACGTTGGTAATT
TAAAGAAGTGAATTTTGATAAAATTGCTGCGACGAAACCCGAAGTAATCTTT
ATCTCTGGACGTACAGCTAATCAAAAGAATTTAGATGAATTCAAAAAGCTGC
ACCTAAAGCGAAAATTGTTTATGTTGGTGCAGATGAAAAGA ACTTAATTGGTT
CAATGAAACAAAACACTGAAAATATCGGAAAATTTACGATAAAGAAGATAA
AGCTAAAGAATTAATAAAGATTTAGATAACAAAATTGCTTCAATGAAAGAT
AAAACGAAAACTTCAATAAAACTGTTATGTATTTACTAGTTAACGAAGGTGA
ATTATCAACATTTGGACCTAAAGGTCGTTTTGGTGGATTAGTTTACGATACATT
AGGATTCAATGCAGTTGATAAAAAAGTAAGTAATAGCAATCATGGACAAAAT
GTTTCTAACGAATATGTTAATAAAGAAAATCCAGATGTTATTTAGCGATGGA
TAGAGGTCAAGCGATAAGTGGTAAATCAACTGCGAAACAAGCATTAAATAAT
CCTGTATTA AAAAATGTTAAAGCAATTAAGAAGACAAAGTATATAATTTAGA
TCCTAAATTATGGTACTTTGCAGCTGGATCAACTACA ACTACAATTAACAAA
TTGAGGAACTTGATAAAGTTGTA AAAATAA
(SEQ ID NO:570)

FIG. 190

ATGAAGAAAACAGTCTTATATTTAGTATTAGCAGTAATGTTTTATTAGCGGC
ATGCGGTAACAATTCTGATAAAGAACAATCAAAATCAGAACTAAAGGTTCT
AAAGATACAGTAAAAATTGAAAATAACTATAAAATGCGTGGCGAGAAAAAAG
ATGGTAGTGACGCTAAAAAGTTAAAGAACTGTTGAAGTACCAAAAAATCC
TAAAAATGCAGTTGTGTTAGACTATGGCGCATTAGATGTAATGAAAGAAATGG
GCTTATCAGATAAAGTAAAAGCATTACCTAAAGGGGAAGGCGGTAAGTCATT
ACCGAATTTCTTAGAATCATTAAAGATGATAAATATACAAACGTTGGTAATT
TAAAAGAAGTGAATTTTGATAAAATTGCTGCGACGAAACCCGAAGTAATCTTT
ATCTCTGGACGTACAGCTAATCAAAGAATTTAGATGAATTCAAAAAGCTGC
ACCTAAAGCGAAAATTGTTTATGTTGGTGCAGATGAAAAGAAGCTTAATTGGTT
CAATGAAACAAAACACTGAAAATATCGGAAAAATTTACGATAAAGAAGATAA
AGCTAAAGAATTAATAAAGATTTAGATAACAAAATTGCTTCAATGAAAGAT
AAAACGAAAACTTCAATAAAACTGTTATGTATTTACTAGTTAACGAAGGTGA
ATTATCAACATTTGGACCTAAAGGTCGTTTTGGTGGATTAGTTTACGATACATT
AGGATTCAATGCAGTTGATAAAAAAGTAAGTAATAGCAATCATGGACAAAAT
GTTTCTAACGAATATGTTAATAAAGAAAATCCAGATGTTATTTAGCGATGGA
TAGAGGTCAAGCGATAAGTGGTAAATCAACTGCGAAACAAGCATTAAATAAT
CCTGTATTAATAAATGTTAAAGCAATTAAGAAGACAAAGTATATAATTTAGA
TCCTAAATTATGGTACTTTGCAGCTGGATCAACTACAACATAAATAAATAA
TTGAGGAACTTGATAAAGTTGTAAAATAA
(SEQ ID NO:571)

FIG. 191

ATGAAGAAAACAGTCTTATATTTAGTATTAGCAGTAATGTTTTATTAGCGGC
ATGCGGTAACAATTCTGATAAAGAACAATCAAAATCAGAACTAAAGGTTCT
AAAGATACAGTAAAAATTGAAAATAACTATAAAATGCGTGGCGAGAAAAAAG
ATGGTAGTGACGCTAAAAAGTTAAAGAACTGTTGAAGTACCAAAAAATCC
TAAAAATGCAGTTGTGTTAGACTATGGCGCATTAGATGTAATGAAAGAAATGG
GCTTATCAGATAAAGTAAAAGCATTACCTAAAGGGGAAGGCGGTAAGTCATT
ACCGAATTTCTTAGAATCATTAAAGATGATAAATATACAAACGTTGGTAATT
TAAAAGAAGTGAATTTTGATAAAATTGCTGCGACGAAACCCGAAGTAATCTTT
ATCTCTGGACGTACAGCTAATCAAAGAATTTAGATGAATTCAAAAAGCTGC
ACCTAAAGCGAAAATTGTTTATGTTGGTGCAGATGAAAAGAAGCTTAATTGGTT

103/112

CAATGAAACAAAACACTGAAAATATCGGTAAAATTTACGATAAAGAAGATAA
AGCTAAAGAATTAATAAAGATTTAGATAACAAAATTGCTTCAATGAAAGAT
AAAACGAAAACTTCAATAAACTGTTATGTATTACTAGTTAACGAAGGTGA
ATTATCAACATTTGGACCTAAAGGTCGTTTTGGTGGATTAGTTTACGATACATT
AGGATTCAATGCAGTTGATAAAAAAGTAAGTAATAGCAATCATGGACAAAAT
GTTTCTAACGAATATGTTAATAAAGAAAATCCAGATGTTATTTTAGCGATGGA
TAGAGGTCAAGCGATAAGTGGTAAATCAACTGCGAAACAAGCATTAAATAAT
CCTGTATTAATAAATGTTAAAGCAATTAAGAAGACAAAGTATATAATTTAGA
TCCTAAATTATGGTACTTTGCAGCTGGATCAACTACAACACTACAATTAACAAA
TTGAGGAACCTTGATAAAGTTGTAATAA

(SEQ ID NO:572)

FIG. 192

ATGAAAAAACTATTATTACCATTAATAATTATGTTATTAGTGTTAGCTGCGTGT
GGGAACCAAGGTGAAAAAATAACAAAGCTGAAACTAAATCTTATAAAATGG
ACGATGGCAAAACGGTAGATATCCGAAAGACCCTAAACGCATTGCAGTAGT
TGCGCCAACATATGCTGGTGGACTTAAAAAATTAGGTGCAAACATTGTAGCTG
TAAATCAACAAGTCGATCAAAGCAAAGTATTAAGAATAAATTTAAAGGTGT
TACAAAAATTGGTGATGGCGATGTAGAAAAGGTTGCTAAAGAAAAGCCAGAT
TTAATTATTGTATACTCTACTGACAAAGACATTAATAAATATCAAAAAGTAGC
ACCAACAGTAGTTGTTGACTATAATAAGCATAAATATTTAGAACACAAGAA
ATGTTAGGGAAAATTGTTGGTAAAGAAGATAAAGTAAAAGCTTGGAAGAAAG
ATTGGGAAGAAACAACACTGCTAAAGACGGTAAAGAAATTAATAAAGCAATTGG
ACAAGATGCAACAGTGTTCGTTGTTTGGATGAATTTGATAAAAAATTATACACTT
ACGGCGATAACTGGGGTCGTTGGTGGAGAAGTACTATATCAAGCATTGTTTAA
AAAATGCAACCAGAACAACAAAAGTTAACTGCAAAAGCAGGTTGGGCTGAAG
TGAAACAAGAAGAAATTGAAAAATATGCTGGTGATTACATTGTGAGTACAAG
TGAAGGTAAACCTACACCAGGATATGAATCAACAAACATGTGGAAGAATTG
AAAGCTACTAAAGAAGGACATATTGTTAAAGTTGATGCTGGTACATACTGGTA
CAACGATCCTTATACATTAGATTTTCATGCGTAAAGATTTAAAGAAAAATTA
TTAAAGCTGCAAAATAA

(SEQ ID NO:573)

FIG. 193

ATGAAAAAACTATTATTACCATTAATAATTATGTTATTAGTGTTAGCTGCGTGT
GGGAACCAAGGTGAAAAAATAACAAAGCTGAAACTAAATCTTATAAAATGG
ACGATGGCAAAACGGTAGATATTCCGAAAGACCCTAAACGCATTGCAGTAGT
TGCGCCAACATATGCTGGTGGACTTAAAAAATTAGGTGCAAACATTGTAGCTG
TAAATCAACAAGTCGATCAAAGCAAAGTATTAAGATAAAATTTAAAGGTGT
TACAAAAATTGGTGATGGCGATGTAGAAAAAGTTGCTAAAGAAAAGCCAGAT
TTAATTATTGTATACTCTACTGACAAAGATATTAATAAATATCAAAAAGTAGC
ACCAACAGTAGTTGTTGACTATAATAAGCATAAATATTTAGAACAACAAGAA
ATGTTAGGGAAAATTGTTGGTAAAGAAGATAAAGTAAAAGCTTGAAGAAAAG
ATTGGGAAGAAACAACACTGCTAAAGACGGTAAAGAAATTAATAAAGCAATTGG
ACAAGATGCAACAGTGTCATTGTTTGTGATGAATTTGATAAAAAATTATACACTT
ACGGCGATAACTGGGGTCGTGGTGGAGAAGTATTATATCAAGCATTGGTTTG
AAAATGCAACCAGAACAACAAAAGTTAACTGCAAAGCAGGTTGGGCTGAAG
TGAAACAAGAAGAAATTGAAAAATATGCTGGTGATTACATTGTGAGTACAAG
TGAAGGTAAACCTACACCAGGATATGAATCAACAAACATGTGGAAGAATTTG
AAAGCTACTAAAGAAGGACATATTGTTAAAGTTGATGCTGGTACATACTGGTA
CAACGATCCTTATACATTAGATTTTCATGCGTAAAGATTTAAAAGAAAATTA
TTAAAGCTGCAAAATAA

(SEQ ID NO:574)

FIG. 194

ATGAAAAAACTATTATTACCATTAATAATTATGTTATTAGTGTTAGCTGCGTGT
GGGAACCAAGGTGAAAAAATAACAAAGCTGAAACTAAATCTTATAAAATGG
ACGATGGCAAAACGGTAGATATTCCGAAAGACCCTAAACGCATTGCAGTAGT
TGCGCCAACATATGCTGGTGGACTTAAAAAATTAGGTGCAAACATTGTAGCTG
TAAATCAACAAGTTGATCAAAGCAAAGTGTAAAGATAAAATTTAAAGGTGT
ACTAAAATTGGTGATGGTGATATAGAAAAAGTTGCTAAAGAAAAGCCAGATT
TAATTATTGTATACTCTACTGACAAAGACATTAATAAAGTATCAAAAAGTAGCA
CCAACAGTAGTTGTTGACTATAATAAGCATAAATACTTAGAACAACAAGAAAT
GTTAGGGAAAATTGTTGGTAAAGAAGATAAAGTAAAAGCTTGAAGAAAAGAT
TGGGAAGAAACAACACTGCTAAAGACGGTAAAGAAATTAATAAAGCAATTGGAC
AAGATGCAACAGTGTCATTGTTTGTGATGAATTTGATAAAAAATTATACACTTAC
GGCGATAACTGGGGTCGTGGTGGAGAAGTATTATATCAAGCATTGTTTAA

105/112

AATGCAACCAGAACAACAAAAGTTAACTGCAAAAGCAGGTTGGGCTGAAGTG
AAACAAGAAGAAATTGAAAAATATGCTGGTGATTACATTGTGAGTACAAGTG
AAGGTAAACCTACACCAGGATACGAATCAACAAACATGTGGAAGAATTTGAA
AGCTACTAAAGAAGGACATATTGTTAAAGTTGATGCTGGTACATACTGGTACA
ACGATCCTTATACATTAGATTTTCATGCGTAAAGATTTAAAAGAAAAATTAATT
AAAGCTGCAAAATAA

(SEQ ID NO:575)

FIG. 195

ATGAAAAAACTATTATTACCATTAATAATTATGTTATTAGTGTTAGCTGCGTGT
GGGAACCAAGGTGAAAAAATAACAAAGCTGAAACTAAATCTTATAAAATGG
ACGATGGCAAAACGGTAGATATTCCGAAAGACCCTAAACGCATTGCAGTAGT
TGCGCCAACATATGCTGGTGGACTTAAAAAATTAGGTGCAAACATTGTAGCTG
TAAATCAACAAGTCGATCAAAGCAAAGTATTAAGATAAATTTAAAGGTGT
TACAAAAATTGGTGATGGCGATGTAGAAAAAGTTGCTAAAGAAAAGCCAGAT
TTAATTATTGTATACTCTACTGACAAAGATATTAATAAATATCAAAAAGTAGC
ACCAACAGTAGTTGTTGACTATAATAAGCATAAATATTTAGAACAACAAGAA
ATGTTAGGGAAAATTGTTGGTAAAGAAGATAAAGTAAAAGCTTGGAAGAAAG
ATTGGGAAGAAACAACCTGCTAAAGACGGTAAAGAAATTAATAAAGCAATTGG
ACAAGATGCAACAGTGTCATTGTTTGATGAATTTGATAAAAAATTATACACTT
ACGGCGATAACTGGGGTCGTGGTGGAGAAGTATTATATCAAGCATTGGTTTA
AAAATGCAACCAGAACAACAAAAGTTAACTGCAAAAGCAGGTTGGGCTGAAG
TGAAACAAGAAGAAATTGAAAAATATGCTGGTGATTACATTGTGAGTACAAG
TGAAGGTAAACCTACACCAGGATATGAATCAACAAACATGTGGAAGAATTTG
AAAGCTACTAAAGAAGGACATATTGTTAAAGTTGATGCTGGTACATACTGGTA
CAACGATCCTTATACATTAGATTTTCATGCGTAAAGATTTAAAAGAAAAATTA
TTAAAGCTGCAAAATAA

(SEQ ID NO:576)

FIG. 196

ATGAAAAAACTATTATTACCATTAATAATTATGTTATTAGTGTTAGCTGCGTGT
GGGAACCAAGGTGAAAAAATAACAAAGCTGAAACTAAATCTTATAAAATGG
ACGATGGCAAAACGGTAGATATTCCGAAAGACCCTAAACGCATTGCAGTAGT
TGCGCCAACATATGCTGGTGGACTTAAAAAATTAGGTGCAAACATTGTAGCTG

106/112

TAAATCAACAAGTCGATCAAAGCAAAGTATTTAAAAGATAAATTTAAAGGTGT
TACAAAAATTGGTGATGGCGATGTAGAAAAAGTTGCTAAAGAAAAGCCAGAT
TTAATTATTGTATACTCTACTGACAAAGATATTTAAAAAATATCAAAAAGTAGC
ACCAACAGTAGTTGTTGACTATAATAAGCATAAATATTTAGAACAACAAGAA
ATGTTAGGGAAAATTGTTGGTAAAGAAGATAAAGTAAAAGCTTGGGAAGAAAG
ATTGGGAAGAAACAACCTGCTAAAGACGGTAAAGAAATTTAAAAAAGCAATTGG
ACAAGATGCAACAGTGTCAATTGTTTGATGAATTTGATAAAAAATTATACACTT
ACGGCGATAACTGGGGTCGTGGTGGAGAAGTATTATATCAAGCATTGGTTTG
AAAATGCAACCAGAACAACAAAAGTTAACTGCAAAAGCAGGTTGGGCTGAAG
TGAAACAAGAAGAAATTGAAAAATATGCTGGTGATTACATTGTGAGTACAAG
TGAAGGTAAACCTACACCAGGATACGAATCAACAAACATGTGGAAGAATTTG
AAAGCTACTAAAGAAGGACATATTGTTAAAGTTGATGCTGGTACATACTGGTA
CAACGATCCTTATACATTAGATTTTCATGCGTAAAGATTTAAAAGAAAATTA
TTAAAGCTGCAAAATAA

(SEQ ID NO:577)

FIG. 197

ATGAAAAAATCTATTATTACCATTAATAATTATGTTATTAGTGTTAGCTGCGTGT
GGGAACCAAGGTGAAAAAATAACAAAGCTGAAACTAAATCTTATAAAATGG
ACGATGGCAAAACGGTAGATATTCGAAAGACCCTAAACGCATTGCAGTAGT
TGCGCCAACATATGCTGGTGGACTTAAAAAATTAGGTGCAAACATTGTAGCTG
TAAATCAACAAGTCGATCAAAGCAAAGTATTTAAAAGATAAATTTAAAGGTGT
TACAAAAATTGGTGATGGCGATGTAGAAAAAGTTGCTAAAGAAAAGCCAGAT
TTAATTATTGTATACTCTACTGACAAAGATATTTAAAAAATATCAAAAAGTAGC
ACCAACAGTAGTTGTTGACTATAATAAGCATAAATATTTAGAACAACAAGAA
ATGTTAGGGAAAATTGTTGGTAAAGAAGATAAAGTAAAAGCCTGGAAGAAAG
ATTGGGAAGAAACAACCTGCTAAAGACGGTAAAGAAATTTAAAAAAGCAATTGG
ACAAGATGCAACAGTGTCAATTGTTTGATGAATTTGATAAAAAATTATACACTT
ACGGCGATAACTGGGGTCGTGGTGGAGAAGTATTATATCAAGCATTGGTTTG
AAAATGCAACCAGAACAACAAAAGTTAACTGCAAAAGCAGGTTGGGCTGAAG
TGAAACAAGAAGAAATTGAAAAATATGCTGGTGATTACATTGTGAGTACAAG
TGAAGGTAAACCTACACCAGGATATGAATCAACAAACATGTGGAAGAATTTG
AAAGCTACTAAAGAAGGACATATTGTTAAAGTTGATGCTGGTACATACTGGTA

107/112

CAACGATCCTTATACATTAGATTCATGCGTAAAGATTTAAAAGAAAAATTAA
TTAAAGCTGCAAAATAA
(SEQ ID NO:578)

FIG. 198

ATGAAAAAACTATTATTACCATTAATAATTATGTTATTAGTGTTAGCTGCGTGT
GGGAACCAAGGTGAAAAAATAACAAAGCTGAAACTAAATCTTATAAAATGG
ACGATGGCAAAACGGTAGATATCCGAAAGACCCTAAACGCATTGCAGTAGT
TGCGCCAACATATGCTGGTGGACTTAAAAAATTAGGTGCAAACATTGTAGCTG
TAAATCAACAAGTCGATCAAAGCAAAGTATTTAAAAGATAAATTTAAAGGTGT
TACAAAAATTGGTGATGGCGATGTAGAAAAAGTTGCTAAAGAAAAGCCAGAT
TTAATTATTGTATACTCTACTGACAAAGATATTTAAAAATATCAAAAAGTAGC
ACCAACAGTAGTTGTTGACTATAATAAGCATAAATATTTAGAACAACAAGAA
ATGTTAGGGAAAATTGTTGGTAAAGAAGATAAAGTAAAAGCTTGAAGAAAAG
ATTGGGAAGAAAACAACCTGCTAAAGACGGTAAAGAAATTTAAAAAGCAATTGG
ACAAGATGCAACAGTGTCAATTGTTTGATGAATTTGATAAAAAATTATACACTT
ACGGCGATAACTGGGGTTCGTGGTGGAGAAGTATTATATCAAGCATTGTTGTTG
AAAATGCAACCAGAACAACAAAAGTTAACTGCAAAAAGCAGGTTGGGCTGAAG
TGAAACAAGAAGAAATTGAAAAATATGCTGGTGATTACATTGTGAGTACAAG
TGAAAGGTAAACCTACACCAGGATACGAATCAACAAACATGTGGAAGAATTTG
AAAGCTACTAAAGAAGGACATATTGTTAAAGTTGATGCTGGTACATACTGGTA
CAACGATCCTTATACATTAGATTCATGCGTAAAGATTTAAAAGAAAAATTAA
TTAAAGCTGCAAAATAA
(SEQ ID NO:579)

FIG. 199

ATGAAAAAACTATTATTACCATTAATAATTATGTTATTAGTGTTAGCTGCGTGT
GGGAACCAAGGTGAAAAAATAACAAAGCTGAAACTAAATCTTATAAAATGG
ACGATGGCAAAACGGTAGATATCCGAAAGACCCTAAACGCATTGCAGTAGT
TGCGCCAACATATGCTGGTGGACTTAAAAAATTAGGTGCAAACATTGTAGCTG
TAAATCAACAAGTCGATCAAAGCAAAGTATTTAAAAGATAAATTTAAAGGTGT
TACAAAAATTGGTGATGGCGATGTAGAAAAAGTTGCTAAAGAAAAGCCAGAT
TTAATTATTGTATACTCTACTGACAAAGATATTTAAAAATATCAAAAAGTAGC
ACCAACAGTAGTTGTTGACTATAATAAGCATAAATATTTAGAACAACAAGAA

ATGTTAGGGAAAATTGTTGGTAAAGAAGATAAAGTAAAAGCTTGGAAGAAAG
ATTGGGAAGAAACAACCTGCTAAAGACGGTAAAGAAATTAATAAAGCAATTGG
ACAAGATGCAACAGTGTTCATTGTTTGTGATGAATTTGATAAAAAATTATACACTT
ACGGCGATAACTGGGGTCGTGGTGGAGAAGTATTATATCAAGCATTGGTTTG
AAAATGCAACCAGAACAACAAAAGTTAACTGCAAAAGCAGGTTGGGCTGAAG
TGAAACAAGAAGAAATTGAAAAATATGCTGGTGATTACATTGTGAGTACAAG
TGAAGGTAAACCTACACCAGGATACGAATCAACAAACATGTGGAAGAATTTG
AAAGCTACTAAAGAAGGACATATTGTTAAAGTTGATGCTGGTACATACTGGTA
CAACGATCCTTATACATTAGATTTTCATGCGTAAAGATTTAAAAGAAAAATTA
TTAAAGCTGCAAAATAA

(SEQ ID NO:580)

FIG. 200

ATGAAAAAACTATTATTACCATTAATAATTATGTTATTAGTGTTAGCTGCGTGT
GGGAACCAAGGTGAAAAAATAACAAAGCTGAAACTAAATCTTATAAAATGG
ACGATGGCAAAACGGTAGATATCCGAAAGACCCTAAACGCATTGCAGTAGT
TGCGCCAACATATGCTGGTGGACTTAAAAAATTAGGTGCAAACATTGTAGCTG
TAAATCAACAAGTCGATCAAAGCAAAGTATTAAGATAAAATTTAAAGGTGT
TACAAAAATTGGTGATGGCGATGTAGAAAAAGTTGCTAAAGAAAAGCCAGAT
TTAATTATTGTATACTCTACTGACAAAGATATTAATAAATATCAAAAAGTAGC
ACCAACAGTAGTTGTTGACTATAATAAGCATAAATATTTAGAACAACAAGAA
ATGTTAGGGAAAATTGTTGGTAAAGAAGATAAAGTAAAAGCTTGGAAGAAAG
ATTGGGAAGAAACAACCTGCTAAAGACGGTAAAGAAATTAATAAAGCAATTGG
ACAAGATGCAACAGTGTTCATTGTTTGTGATGAATTTGATAAAAAATTATACACTT
ACGGCGATAACTGGGGTCGTGGTGGAGAAGTATTATATCAAGCATTGGTTTG
AAAATGCAACCAGAACAACAAAAGTTAACTGCAAAAGCAGGTTGGGCTGAAG
TGAAACAAGAAGAAATTGAAAAATATGCTGGTGATTACATTGTGAGTACAAG
TGAAGGTAAACCTACACCAGGATACGAATCAACAAACATGTGGAAGAATTTG
AAAGCTACTAAAGAAGGACATATTGTTAAAGTTGATGCTGGTACATACTGGTA
CAACGATCCTTATACATTAGATTTTCATGCGTAAAGATTTAAAAGAAAAATTA
TTAAAGCTGCAAAATAA

(SEQ ID NO:581)

FIG. 201

ATGAAAAAACTATTATTACCATTAATAATTATGTTATTAGTGTTAGCTGCGTGT
GGGAACCAAGGTGAAAAAAATAACAAAGCTGAAACTAAATCTTATAAAATGG
ACGATGGCAAAACGGTAGATATTCCGAAAGACCCTAAACGCATTGCAGTAGT
TGCGCCAACATATGCTGGTGGACTTAAAAAATTAGGTGCAAACATTGTAGCTG
TAAATCAACAAGTCGATCAAAGCAAAGTATTAAGATAAAATTTAAAGGTGT
TACAAAAATTGGTGATGGCGATGTAGAAAAAGTTGCTAAAGAAAAGCCAGAT
TTAATTATTGTATACTCTACTGACAAAGATATTAAAAAATATCAAAAAGTAGC
ACCAACAGTAGTTGTTGACTATAATAAGCATAAAATATTTAGAACAACAAGAA
ATGTTAGGGAAAATTGTTGGTAAAGAAGATAAAGTAAAAGCTTGGAAGAAAG
ATTGGGAAGAAACAACACTGCTAAAGACGGTAAAGAAATTA AAAAAGCAATTGG
ACAAGATGCAACAGTGTCATTGTTTGATGAATTTGATAAAAAATTATACACTT
ACGGCGATAACTGGGGTCGTGGTGGAGAAGTATTATATCAAGCATTGTTTA
AAAATGCAACCAGAACAACAAAAGTTAACTGCAAAGCAGGTTGGGCTGAAG
TGAAACAAGAAGAAATTGAAAAATATGCTGGTGATTACATTGTGAGTACAAG
TGAAGGTAAACCTACACCAGGATATGAATCAACAAACATGTGGAAGAATTTG
AAAGCTACTAAAGAAGGACATATTGTTAAAGTTGATGCTGGTACATACTGGTA
CAACGATCCTTATACATTAGATTTTCATGCGTAAAGATTTAAAAGAAAAATTAA
TTAAAGCTGCAAAAATAA

(SEQ ID NO:582)

FIG. 202

Western Blot: Soro de Camundongo Convalescente

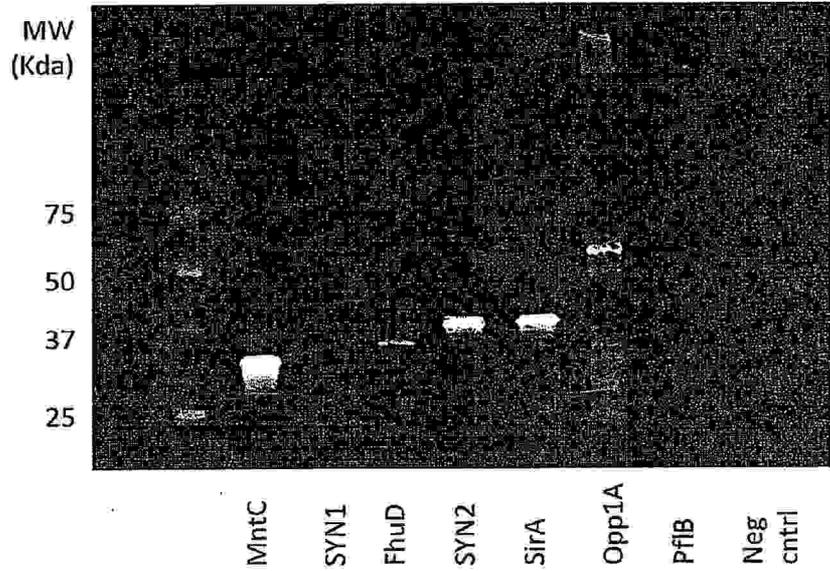


FIG. 203

Western Blot: Soro Humano Saudável

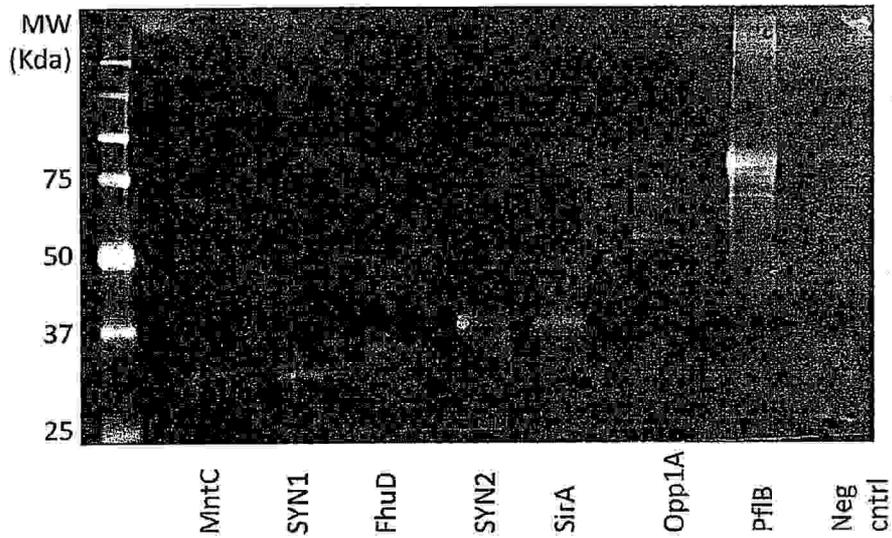


FIG. 204

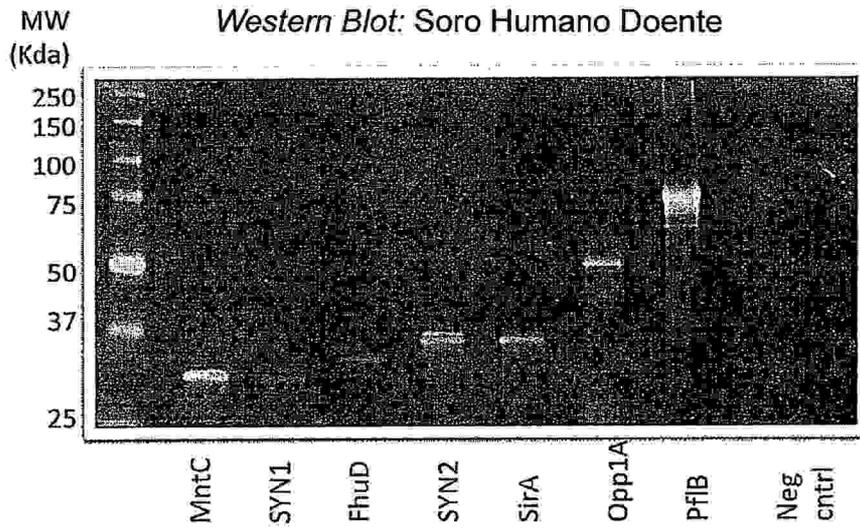
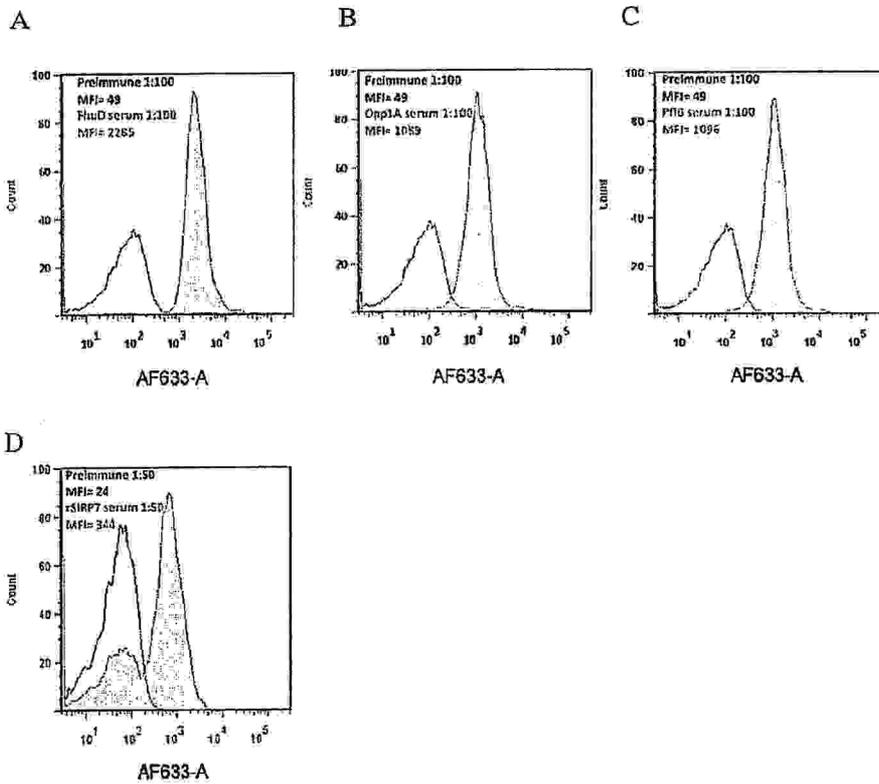


FIG. 205



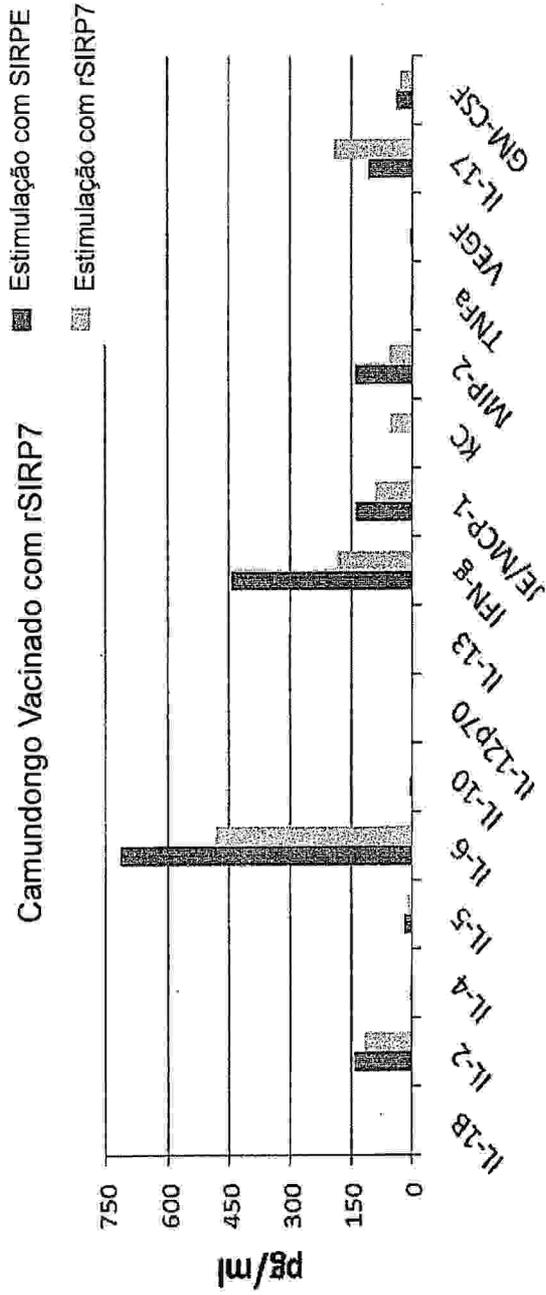


FIG. 206

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DE INFECÇÃO, DE SINTOMA OU DIMINUIÇÃO DA COLONIZAÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS SPP., CONTENDO POLIPEPTÍDEOS GRAM-POSITIVOS, KIT PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS QUE SE LIGAM ESPECIFICAMENTE A TAIS POLIPEPTÍDEOS, BEM COMO USO DOS MESMOS".**

A presente invenção provê polipeptídeos isolados isoláveis de uma *Staphylococcus spp.* São também providas pela presente invenção composições que incluem um ou mais dos polipeptídeos e métodos para fabricação e métodos para uso dos polipeptídeos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



112B8ADCA1DE713F

Campo 2



827246C323134B7A

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: p179307-Listagem de sequência.txt
- Data de Geração do Código: 20-09-2011
- Hora de Geração do Código: 13:21:43
- Código de Controle:
 - Campo 1: 112B8ADCA1DE713F
 - Campo 2: 827246C323134B7A