



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 891**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/01 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03762684 .3**

86 Fecha de presentación : **09.07.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1523572**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.04.2005**

54

Título: **Determinantes de patogenicidad que se pueden usar como dianas para desarrollar medios para la prevención y el control de infecciones bacterianas y/o diseminación sistémica.**

30

Prioridad: **09.07.2002 FR 02 08636**

73

Titular/es: **Mutabilis**
156, avenue Vaugirard
75730 Paris Cédex 15, FR

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2008

72

Inventor/es: **Escaich, Sonia**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2008

74

Agente: **Ruo, Alessandro**

ES 2 306 891 T3

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

ES 2 306 891 T3

DESCRIPCIÓN

Determinantes de patogenicidad que se pueden usar como dianas para desarrollar medios para la prevención y el control de infecciones bacterianas y/o diseminación sistémica.

La invención se refiere a determinantes de patogenicidad que se pueden usar como dianas para desarrollar medios para la prevención y el control de infecciones bacterianas y/o diseminación sistémica.

Los tratamientos actuales para enfermedades infecciosas de origen bacteriano se basan en la inhibición *in vitro* de dianas bacterianas esenciales usando antibióticos. Estas dianas están conservadas en muchas especies bacterianas y hacen posible tratar diversos tipos de infecciones. No obstante, los antibióticos de amplio espectro son activos sobre la flora comensal del hospedador, lo que estimula la adquisición y transferencia de mecanismos de resistencia a estos antibióticos, limitando así la eficacia de los tratamientos actuales con antibióticos. Por tanto existe la necesidad de nuevos tratamientos antibacterianos.

En este aspecto, la invención proporciona una nueva estrategia, cuyo objetivo es dirigirse específicamente a bacterias patógenas sin alterar significativamente su crecimiento en su portal de entrada en el organismo hospedador, donde están en situación de comensalismo. En particular estos patógenos son las bacterias responsables de infecciones sistémicas graves tales como *E. coli*, en general, *Enterobacteria*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* y *Neisseria* y, para las gram positivas, las bacterias del género *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*.

Se sabe, específicamente, que las bacterias responsables de infecciones graves son capaces de crecer en presencia de suero y son resistentes a la acción bactericida del complemento. Esta resistencia permite la diseminación de la infección, a través de la sangre, a los diversos tejidos del cuerpo del hospedador.

La capacidad de las bacterias para crecer en el suero humano es debida a diferentes factores de patogenicidad/virulencia. Entre aquellos citados frecuentemente, se hará mención a la barrera física, representada por la cápsula, para el acceso del complemento a la membrana bacteriana, los ácidos siálicos de la cápsula o del antígeno O que estimula la unión del factor H a c3b, y proteínas de superficie particulares tales como PorA (*Neisseria gonorrhoeae*), YadA (*Yersinia pestis*) o la proteína M (*Streptococcus pyogenes*), que se une al factor H, evitando todos estos factores la activación del complemento.

Otras proteínas expresadas o unidas por los patógenos han demostrado ser importantes para la resistencia al complemento y provocan la escisión de los factores del complemento o inhiben su unión a la superficie de la bacteria (Rautemaa R.; Meri S., *Microbes and Infection* 1999, 1:785:794).

Se sabe que el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gram negativas es un factor de virulencia, pero el papel de sus diversos constituyentes en la resistencia al suero no ha sido establecido para todas las especies bacterianas. Por ejemplo, en algunos estudios en *E. coli*, el antígeno O se considera que es determinante (Burns S.M. *Infect Immun*, 1998, Sept 66 (9):4244-53); en otros estudios, se piensa que el antígeno O es menos determinante que los antígenos de la cápsula para la resistencia al suero (Russo T. y col., *Infect Immun*, 1995, Abr. 63(4):1263-9). Además, se desconoce la importancia de estos factores en la colonización intestinal.

Los inventores han llevado a cabo un análisis sistemático de mutantes buscando la inactivación de los genes necesarios para la síntesis del polisacárido superficial, y han demostrado, en cepas de *Escherichia coli* responsables de infecciones extra-intestinales, EXPEC, qué genes son esenciales para la resistencia al suero y la diseminación en la sangre. Estos resultados se basan en el estudio del efecto de mutaciones sobre la virulencia y la colonización intestinal en un modelo animal.

Por tanto la invención se dirige a una nueva metodología para definir las dianas necesarias para la virulencia, y no esenciales *in vitro*, y que proporciona así nuevos agentes anti-infecciosos específicos para bacterias patógenas, en particular, para *E. coli* extra-intestinal, responsable de infecciones graves, así como de cepas gram positiva, tales como *Streptococcus agalactiae*. También se dirige a los productos de los genes necesarios para la resistencia en el suero y la virulencia *in vivo*.

El procedimiento de la invención para la identificación y selección de las dianas de los genes de virulencia en bacterias patógenas se caracteriza porque comprende:

- el uso de una cepa del microorganismo patógeno,
- la generación de mutantes por inactivación en los genes que codifican los factores de virulencia,
- la determinación de la virulencia de estos mutantes en un modelo experimental de infección y su efecto sobre la colonización entérica en un modelo de ratón axénico, y
- la identificación y selección de las bacterias con una mutación en los genes que demuestran tener todas las características siguientes: genes no esenciales para la proliferación *in vitro*, no esenciales para la coloniza-

ES 2 306 891 T3

ción comensal, pero esenciales para la resistencia al suero *in vitro*, y esenciales, en el hospedador, para la diseminación en sangre.

5 La invención también se refiere a un procedimiento tal como se ha definido anteriormente, que comprende la etapa de evaluación de la viabilidad *in vitro* de las bacterias mutantes y su capacidad para resistir y proliferar en presencia de suero con complemento.

El microorganismo patógeno es, en particular, una cepa EXPEC de *E. coli*.

10 La invención también se refiere a un procedimiento *in vitro* para la inhibición de la virulencia de bacterias patógenas, que comprende dirigir un inhibidor de un ácido nucleico de ID. de SEC. N° 16, 20, 27 ó 28 o un péptido de ID. de SEC. N° 1, 5, 12 ó 13, para incrementar la sensibilidad de la bacteria al suero y atenuar su virulencia.

15 La invención también se dirige a un procedimiento *in vitro* como se ha definido anteriormente en el que los ácidos nucleicos, sus productos de expresión o los péptidos, que son necesarios para la diseminación a través de la sangre, pero que no afectan significativamente a la colonización intestinal o de las mucosas de bacterias patógenas tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acetivobacter*, *Moraxella catarrhalis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis*.

En un procedimiento según la invención, dichos ácidos nucleicos, productos de expresión y péptidos son ácidos nucleicos, productos de expresión o péptidos de *E. coli*, respectivamente.

25 Se han obtenido dianas de patogenicidad o virulencia codificadas por ácidos nucleicos aislados o purificados con las ID. de SEC. N° 16-30.

Se han obtenido dianas de patogenicidad o virulencia correspondientes a polipéptidos o péptidos aislados o purificados con una de las secuencias de aminoácidos ID. de SEC. N° 1-15.

30 Estos ácidos nucleicos y péptidos o polipéptidos constituyen dianas para identificar compuestos con un efecto inhibitorio específico sobre la diseminación sistémica de una infección bacteriana, y no sobre la colonización de la mucosa o, para enterobacterias, sobre la colonización intestinal, que hace posible preservar la flora comensal y evitar la selección de resistencia a los compuestos.

35 Así la invención se dirige a un procedimiento para la selección de inhibidores de los productos de expresión o péptidos de bacterias patógenas, que comprende la puesta en contacto de un ácido nucleico aislado o purificado de ID. de SEC. N° 16, 20, 27 ó 28 o sus productos de expresión, o un péptido aislado o purificado de ID. de SEC. N° 1, 5, 12 ó 13 con el compuesto de prueba, la detección del posible efecto del compuesto sobre la actividad de los productos de expresión o de los péptidos, y la selección de los compuestos con una actividad inhibidora de la virulencia.

También se dirige a un procedimiento para la selección de compuestos capaces de inhibir la actividad bioquímica y/o enzimática de los polipéptidos y péptidos expresados por dichos ácidos nucleicos.

45 Dicho procedimiento para la selección de inhibidores de la actividad bioquímica y/o enzimática de los productos de expresión o péptidos usados, que comprende la puesta en contacto de dichos productos de expresión o péptidos con el compuesto de prueba, la detección del posible efecto del compuesto sobre la actividad de los péptidos sobre la virulencia, y la selección de los compuestos activos.

50 También se dirige a un procedimiento para el uso en la composición de un producto antibacteriano que previene la diseminación de la infección en el hospedador a través de la sangre que comprende la puesta en contacto de los péptidos usados de ID. de SEC. N° 1, 5, 12 ó 13 con el compuesto candidato, la detección del posible efecto del compuesto sobre la actividad de los productos de expresión o los péptidos sobre la virulencia, y la selección del compuesto activo.

55 La invención también se refiere al uso de ID. de SEC. N° 1, 5, 12 ó 13 en un procedimiento para inhibir la virulencia de bacterias que comprende,

- la medición de la actividad enzimática de dicho péptido,

60 - la comprobación de la multiplicación de las bacterias en presencia de suero y suero sin complemento,

- la determinación de la virulencia y la proliferación de las bacterias en un modelo de infección *in vivo* y la determinación del efecto sobre la colonización intestinal en un modelo *in vivo* de ratón axénico.

65 Así la invención proporciona una nueva estrategia y nuevos medios para prevenir o tratar una diseminación bacteriana sistémica, bacteremia y septicemia.

ES 2 306 891 T3

En los siguientes ejemplos se proporcionarán otras características y ventajas de la invención, con referencia a las Figuras 1 a 3 y a las tablas 1 a 5, representando dichas figuras, respectivamente,

la fig. 1, el crecimiento de S26 y del mutante pg23 en suero,

la fig. 2 el crecimiento de S26 y del mutante pg23 en suero sin complemento; y

la fig. 3 la virulencia del mutante DltD de *S. agalactiae*.

Ejemplo 1

Gen correspondiente a la ID. de SEC. N° 23

1 - Inactivación del gen de interés

La estrategia general, basada en un sistema de recombinación, consiste en interrumpir un gen, por recombinación alélica, con un gen para la selección (un gen para la resistencia a un antibiótico, en este caso) portado por un fragmento de ADN lineal.

Inicialmente, se introduce un plásmido en la bacteria (por ejemplo, *E. coli*), para así introducir, in trans, las proteínas que inducirán la recombinación. El plásmido que porta un gen de resistencia a la ampicilina es sensible a la temperatura (30°C), lo que hará posible eliminarlo fácilmente después de su uso en la bacteria.

El plásmido se introduce en la bacteria por electroporación. Después de la electroporación, las bacterias resistentes a ampicilina serán aquellas que hayan integrado el plásmido, y se seleccionarán. Esta etapa se lleva enteramente a cabo a 30°C, la temperatura permitida por el plásmido.

Síntesis del fragmento de la PCR específico del gen diana (pg23)

Se lleva a cabo una PCR, sobre un plásmido matriz que porta el gen de selección (resistencia a cloranfenicol), usando los cebadores pg23P1 y pg23P2 de las secuencias ID. de SEC. N° 31 e ID. de SEC. N° 32, respectivamente, compuestos de dos partes:

en 3': 20 pb homólogas al gen de selección (resistencia a cloranfenicol): P1 o P2

en 5': 40 pb homólogas al gen diana (pg23): H1 o H2

```
pg23P1 : 5'  
TCGTGCAGGCCAACCTGCACAACAGAGTGATTTGATTAACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC  
3'  
H1 P1  
  
Pg23P2 : 5'  
CAGGGTGCTGGCGCTCACCATTTCCGGAGACAGCTTAGACACATATGAATATCCTCCTTA  
3'  
H2 P2
```

Así se obtiene un fragmento de ADN constituido por el gen de selección (CAT: cloranfenicol acetil transferasa) flanqueado por las regiones homólogas al gen diana H1 y H2.

Etapa de inactivación del gen diana

La bacteria que contiene el plásmido se cultiva en medio LB a 30°C con agitación, en presencia de ampicilina 100 mM y de L-arabinosa 1 mM para así inducir el sistema de recombinación. Cuando las bacterias están en la fase de crecimiento exponencial ($DO_{600nm} = 0,5$), el cultivo se detiene, y las bacterias se recogen y se hacen electrocompetentes. El producto de la PCR específico para el gen diana (pg23) se introduce en las bacterias por electroporación. A continuación las bacterias se cultivan en un medio rico no selectivo (medio SOC) a 37°C con agitación durante 2 horas, y a continuación se ponen en placa sobre medio agar LB selectivo. Después de 18 horas a 37°C, solamente habrán crecido las bacterias que hayan integrado el gen de resistencia al antibiótico.

ES 2 306 891 T3

Verificación de la inserción del casete de resistencia

Para verificar la inserción del casete de resistencia, las reacciones de PCR se llevan a cabo directamente usando las colonias. Se usan tres pares de cebadores: un par en los que los cebadores FR1 y FR2 enmarcan el gen diana, y dos pares que usan un cebador localizado en el interior del casete de resistencia, estando localizado el otro cebador aguas arriba o aguas abajo del gen diana.

Aislamiento de la bacteria mutada y eliminación del plásmido

Las colonias así verificadas por PCR se vuelven a aislar sucesivamente sobre el medio seleccionado, dos veces sobre medio no selectivo y una última vez sobre medio selectivo a 37°C. Finalmente, las bacterias seleccionadas se prueban para su sensibilidad a ampicilina, que refleja la ausencia del plásmido. Así se seleccionan tres clones para cada tipo de mutante.

15

2 - Prueba del mutante con respecto a la resistencia a la actividad bactericida del suero

El suero usado es de origen humano. En cada experimento, también se llevó a cabo el crecimiento de la cepa silvestre (S26, aislado clínico de *E. coli* particularmente resistente al suero y virulento en ratones) y una cepa, ECOR4, que carece de cápsula y lipopolisacárido (LPS). Los crecimientos se llevaron a cabo por triplicado y en dos sueros diferentes. Los crecimientos se llevaron a cabo en paralelo en suero con complemento y sin complemento (30 minutos a 56°C) para verificar que el efecto observado era debido solamente a la acción lítica del complemento.

Usando un precultivo de dos horas en medio mínimo de referencia RPMI, las bacterias se pusieron en contacto con suero al 100%, a un inóculo de partida de 10^4 ufc/ml. A continuación el conteo se realizó a las 0, 1 y 4 horas, poniendo en placa diversas diluciones del medio de agar LB en presencia o ausencia de antibiótico. Después de 18 horas a 37°C, las bacterias se contaron y se obtuvo una curva de crecimiento a partir de los resultados obtenidos. Estos resultados se proporcionan en las Figuras 1 y 2.

En este ejemplo, el mutante Δ pg23 presenta una sensibilidad considerable al suero: de hecho se observa una diferencia con la cepa silvestre superior a 2 unidades logarítmicas en 1 hora y superior a 4 unidades logarítmicas en 4 horas. Además, los resultados obtenidos en el suero sin complemento y con la cepa ECOR4 en suero indican que el efecto observado es debido a la acción bactericida del complemento.

35

3 - Estudio de la virulencia en un modelo animal de ratón

Preparación del inóculo

Las bacterias mutadas silvestres se aislaron a partir de la cepa, se almacenaron a -80°C, sobre una placa de agar LB con o sin antibiótico, y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Se preparó un precultivo en medio líquido. Usando una dilución 1/10 en 10 ml de LB, el cultivo se volvió a realizar a 37°C con agitación durante 2 horas. Después de cultivar durante 2 horas, se midió la DO_{600nm} y se prepararon diversas diluciones en solución salina fisiológica, para así obtener el inóculo deseado. Para la cepa silvestre S26, la DL_{50} corresponde a un inóculo de 5×10^5 ufc/ratón y la DL_{100} corresponde a un inóculo de 1×10^6 ufc/ratón.

Prueba de virulencia

Se administró una inyección intraperitoneal a ratones (Balb/c de 6 semanas de edad) y la disolución bacteriana inyectada representa un volumen de 100 μ l. Se usaron cinco ratones por dosis. Para S26 Δ pg23, se probaron 4 inóculos y se midió la tasa de supervivencia después de 24 y 48 horas tras la inyección. En cada experimento, el estudio se llevó a cabo en paralelo con la cepa silvestre, cuya DL_{50} es 5×10^5 ufc/ratón.

La S26 Δ pg23 mutante, inyectada a una dosis igual a 10 veces la DL_{100} , no provoca mortalidad, por tanto la mutación del gen p23 en la cepa K1 S26 de *E. coli* es responsable de un descenso considerable en la virulencia.

4 - Estudio de la colonización intestinal en un modelo animal de ratón axénico

Todo el experimento se llevó a cabo en un entorno estéril, con instrumentos estériles, en un aislante, y se administró a los ratones alimento estéril.

Ratones

Son ratones hembra axénicos de 6 a 8 semanas de edad de la línea C3H/He J.

Se usaron cuatro animales por cepa bacteriana.

ES 2 306 891 T3

Preparación del inóculo

Las bacterias silvestres y mutadas se aislaron a partir de la cepa, se almacenaron a -80°C , en una placa de agar LB con o sin antibiótico, y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Después de cultivar la cepa en medio líquido, se prepararon diversas diluciones en solución salina fisiológica, para así obtener un inóculo de 10^7 ufc/ml.

Prueba de colonización

La inoculación bacteriana se llevó a cabo oralmente. Durante las 24 horas previas a la inoculación, los ratones fueron privados de agua. A continuación se les administró para beber una disolución bacteriana de 10^7 ufc/ml durante 4 horas. Se midió el volumen de la bebida a las 0 y 4 horas, y, de media, un ratón absorbe 5 ml de esta disolución bacteriana. A continuación se tomaron muestras de las heces en diversos momentos, y se realizó el recuento bacteriano, llevando las heces a una solución salina fisiológica y poniendo en placa diversas diluciones sobre una placa de agar LB con y sin antibiótico.

Los resultados se proporcionan en la tabla 1 a continuación.

TABLA 1

Tiempo en horas	UFC/mg de heces	
	S26wt	S26 Δ pg23
0	0	0
4	6,85E+05	1,65E+05
25	1,86E+06	2,84E+06
118	8,34E+06	7,94E+06
456	4,14E+06	6,64E+06

Para la cepa silvestre S26, así como para el mutante S26 Δ pg23, se estableció de forma estable la colonización del intestino. No se observaron diferencias entre la cepa silvestre y el mutante Δ pg23. La colonización se confirmó el último día extrayendo el intestino y contando las bacterias después de triturar este órgano.

5 - Clonación y expresión del polipéptido seleccionado

El ácido nucleico que codifica el polipéptido se clonó en un vector de expresión procariota tal como pET-14b con una cola de poli-his N-terminal, según los procedimientos de clonación convencionales.

A continuación el plásmido recombinante se usó para transformar la cepa de *E. coli* BL21. Las células transformadas se seleccionaron en presencia de ampicilina y las colonias se aislaron. A continuación se cultivaron en presencia de IPTG para inducir la expresión de la proteína. Los clones que producen la proteína se cultivaron y las proteínas totales se extrajeron mediante tisis celular. La proteína recombinante se purificó con una columna de afinidad por la marca de histidina, según el protocolo del fabricante.

La proteína así obtenida se purificó y se usó *in vitro* para medir su actividad enzimática.

Ejemplo 2

Sensibilidad al suero determinación de la DL_{50} de cepas mutantes en el modelo de infección en ratón

Dichos mutantes también se compararon con la cepa silvestre S26 de *E. coli* para la determinación de la DL_{50} en el modelo de infección en ratón.

Según se presenta en la Tabla 2 a continuación, el número de unidades formadoras de colonias (ufc) contadas después del cultivo durante cuatro horas en suero fue superior en la cepa silvestre (wt) S26 que en los mutantes, que indica que esos mutantes eran sensibles a la muerte en el suero.

Todos los mutantes diferentes bien eran mucho menos virulentos en ratones que la cepa silvestre, como lo demuestra el incremento en la DL_{50} (dosis letal 50), o bien completamente avirulentos, ya que con los mutantes no se pudo alcanzar una dosis que matase al 50% de los ratones.

ES 2 306 891 T3

TABLA 2

Sensibilidad al suero y atenuación de la virulencia para los mutantes K1 S26 de *E. coli* en las proteínas correspondientes al número de secuencia 1 a 13

Número de secuencia	Sensibilidad al suero $\Delta\log$ (ufc/ml de suero)	Atenuación de la virulencia * $\Delta\log$ (DL ₅₀)
1	+4	avirulento ^a
2	+4	+1
3	+5	+1
4	+4	+1
5	+4	+2,5
6	+4	+0,5
7	+4	+0,5
8	+4	avirulento ^a
9	+1	avirulento ^a
10	+2	avirulento ^a
11	+4	+2
12	+4	+2
13	+4	avirulento ^a

avirulento^a: con ese mutante no se pudo alcanzar una dosis que matase al 50% de los ratones

$\Delta\log$ (ufc/ml de suero) = \log (ufc de S26wt/ml de suero) - \log (ufc de S26 mutante/ml de suero) valores obtenidos después de 4 horas en suero

* $\Delta\log$ (DL₅₀) = \log (DL₅₀ de S26 mutante) - \log (DL₅₀ de S26wt) valores obtenidos 48 horas después de la inoculación

Los mutantes de los genes que codifican las proteínas dianas correspondientes a las secuencias 1 a 13, que se atenuaron para la virulencia, aún eran capaces de colonizar el intestino de ratones axénicos como lo demuestra la persistencia de bacterias en las heces de los animales durante un período de ocho días. Estos resultados se presentan en la Tabla 3.

TABLA 3

Colonización del intestino para <i>E. coli</i> K1 S26 wt y mutantes en las proteínas correspondientes al número de secuencia 1 a 13 en un modelo de ratón axénico			
	Número de secuencia	Colonización del intestino	
		ufc/mg de heces	
		Día 1	Día 8
S26wt		* $1,34 \times 10^6$	* $5,29 \times 10^6$
S26 mutantes	1	$9,73 \times 10^5$	$2,51 \times 10^6$
	2	$1,02 \times 10^6$	$6,85 \times 10^6$
	3	$1,44 \times 10^6$	$3,48 \times 10^6$
	4	$1,24 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
	5	$1,15 \times 10^5$	$4,64 \times 10^5$
	6	$9,96 \times 10^5$	$3,51 \times 10^6$
	7	$2,40 \times 10^4$	$2,51 \times 10^6$
	8	$2,84 \times 10^6$	$6,64 \times 10^6$
	9	$1,80 \times 10^6$	$1,51 \times 10^6$
	10	$9,62 \times 10^5$	$2,24 \times 10^6$
	11	$2,72 \times 10^5$	$8,56 \times 10^5$
	12	$3,13 \times 10^5$	$9,09 \times 10^5$
	13	$5,91 \times 10^5$	$1,67 \times 10^6$
* valores medios basados en seis experimentos			

Las bacterias que colonizan el intestino de ratones axénicos después de ocho días se caracterizaron para verificar que correspondían a las cepas mutantes que se inocularon oralmente.

Las bacterias recuperadas de las heces de los animales tenían un fenotipo de resistencia a cloranfenicol y sensibilidad al suero, también se pudo detectar por PCR el gen de la cloranfenicol acetil transferasa insertado durante la mutagénesis.

Las mutaciones en los genes que codifican las proteínas diana (número de secuencia 1 a 13) seguían presentes en las bacterias que colonizan el intestino de ratones axénicos como se muestra en la Tabla 4.

TABLA 4

Caracterización de bacterias recuperadas de ratones axénicos después de la colonización intestinal por mutantes en genes que codifican la secuencia de proteínas 1 a 13		
Secuencia	Sensibilidad al suero	* Mutante
Número	$\Delta\log$ (ufc/ml de suero)	Genotipo
1	+5	Cm ^R , PCR +
2	+4	Cm ^R
3	+5	Cm ^R
4	+3	Cm ^R
5	+5	Cm ^R , PCR +
6	+2	Cm ^R
7	+2	Cm ^R
8	Nd	Cm ^R
9	+2	Cm ^R
10	+3	Cm ^R
11	+5	Cm ^R , PCR +
12	+4	Cm ^R , PCR +
13	+4	Cm ^R , PCR +

$\Delta\log$ (ufc/ml de suero) = \log (ufc de S26wt/ml de suero) - \log (ufc de S26 mutante/ml de suero) valores obtenidos después de 4 horas en suero

* La presencia del gen que codifica la cloranfenicol acetil transferasa, que inactiva los genes que codifican las proteínas de número de secuencia 1 a 13, se ha verificado por PCR y resistencia a cloranfenicol (Cm^R)

En conclusión, los resultados presentados en este ejemplo demuestran que los genes que codifican las enzimas involucradas en el metabolismo del núcleo interno del LPS no son esenciales en cepas de *E. coli* para la colonización, pero son necesarias para la resistencia al complemento y la virulencia *in vivo*.

Representan buenas dianas para inhibidores que bloquearán selectivamente la replicación bacteriana en tejido sanguíneo.

Ejemplo 2

Mutantes de ID de SEC. de proteína N° 14

La presente invención se refiere a una nueva cepa mutante del grupo B de *Streptococcus* (GBS) (*Streptococcus agalactiae*). En este ejemplo particular, las dianas identificadas corresponden al gen con un número de secuencia 29 que codifica una proteína con un número de secuencia 14 involucrada en la incorporación de residuos de D-alanina en los ácidos lipoteicoicos asociados a la pared celular (LTAs) en bacterias gram +.

El gen con el número de secuencia 29 es homólogo del gen *dltD* encontrado en otras bacterias gram positivas y es el último gen del operón *dlt*.

ES 2 306 891 T3

El modelo de bacterias gram + usado es la cepa patógena *S. agalactiae* NEM316. *S. agalactiae* es una bacteria encontrada normalmente en la flora humana y está filogenéticamente próxima a bacterias gram + responsables de la septicemia nosocomial.

5 La virulencia de los mutantes GBS en el operón *dlt* está fuertemente deteriorada en modelos de ratón y de rata neonata.

De manera interesante, la pérdida de virulencia presumiblemente se debe a un incremento en la sensibilidad a péptidos catiónicos antimicrobianos, tales como defensinas, que son producidos por numerosos tipos celulares, en particular, fagocitos.

El uso de un mutante de *S. agalactiae*, en el que se ha inactivado el gen *dltD*, demuestra que el producto de ese gen es una buena diana para el desarrollo de inhibidores de la virulencia de *S. agalactiae* así como de otros patógenos gram +.

15

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse posibles errores u omisiones y la OEP niega cualquier responsabilidad al respecto.

20

Documentos de patentes no citados en la descripción

25

- RAUTEMAA R.; MERI S. *Microbes and Infection*, 1999, vol. 1, 785-794 [0006]
- BURNS S.M.; HULL S.I. *Infect Immun*, 06 September 1998, vol. 6 (9), 4244-53 [0007]
- RUSSO T. *et al. Infect Immun*, 06 April 1995, vol. 3 (4), 1263-9 [0007]

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 306 891 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para identificar y seleccionar dianas de genes de virulencia en bacterias patógenas, que comprende las siguientes etapas:
- uso de una cepa de la bacteria patógena,
 - generación de cepas mutantes para la inactivación de genes que codifican los factores de virulencia,
 - 10 - determinación de la virulencia de la bacteria mutada en un modelo experimental de infección, y su efecto sobre la colonización entérica en un modelo de ratón axénico, y
 - la identificación y selección de las bacterias con una mutación en los genes que demuestran tener todas las siguientes características: genes no esenciales para la proliferación *in vitro*, no esenciales para la colonización comensal, pero esenciales para la resistencia al suero *in vitro*, y esenciales, en el hospedador, para la diseminación en sangre.
 - 15
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende la etapa de evaluación de la vialidad de la bacteria mutante *in vitro* y su capacidad para resistir y proliferar en presencia de suero con complemento.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que las bacterias patógenas son cepas EXPEC de *E. coli*.
4. Procedimiento *in vitro* para inhibir la virulencia de bacterias patógenas, que comprende dirigir un inhibidor de un ácido nucleico con una ID de SEC. N° 16, 20, 27 ó 28 o un péptido con una ID de SEC. N° 1, 5, 12 ó 13, para incrementar la sensibilidad al suero de las bacterias y atenuar su virulencia.
- 25 5. El procedimiento según la reivindicación 4, en el que dichos ácidos nucleicos, sus productos de expresión o péptidos corresponden a aquéllos de los organismos patógenos, que comprenden *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pestis*, *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acetivobacter*, *Moraxella catarrhalis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis*.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dichos ácidos nucleicos, productos de expresión o péptidos son ácidos nucleicos, productos de expresión o péptidos de *E. coli*, respectivamente.
- 35 7. Un procedimiento para la selección de inhibidores de los productos de expresión o péptidos de bacterias patógenas, que comprende la puesta en contacto de un ácido nucleico aislado o purificado con la ID de SEC. N° 16, 20, 27 ó 28 o sus productos de expresión, o un péptido aislado o purificado con una ID de SEC. N° 1, 5, 12 ó 13 con el compuesto de prueba, la detección del posible efecto del compuesto sobre la actividad de los productos de expresión o los péptidos, y la selección de los compuestos con una actividad inhibidora sobre la virulencia.
- 40 8. Un procedimiento para la selección de inhibidores de la actividad bioquímica y/o enzimática de los productos de expresión o péptidos usados según la reivindicación 4, que comprende la puesta en contacto de dichos productos de expresión o péptidos con el compuesto de prueba, la detección del posible efecto del compuesto sobre la actividad de los péptidos sobre la virulencia, y la selección de los compuestos activos.
- 45 9. Un procedimiento para identificar un compuesto candidato para su uso en la composición de un producto antibacteriano que previene la diseminación de la infección en el hospedador a través de la sangre que comprende la puesta en contacto de los péptidos usados según la reivindicación 4 con el compuesto candidato, la detección del posible efecto del compuesto sobre la actividad de los productos de expresión o los péptidos sobre la virulencia, y la selección del compuesto activo.
- 50 10. Uso de la ID de SEC. N° 1, 5, 12 ó 13 en un procedimiento para inhibir la virulencia de bacterias que comprende,
- 55 - la medición de la actividad enzimática de dicho péptido,
 - la evaluación de la multiplicación de las bacterias en presencia de suero y suero sin complemento,
 - 60 - la determinación de la virulencia y la proliferación de las bacterias en un modelo de infección *in vivo* y la determinación del efecto sobre la colonización intestinal en un modelo axénico de ratón *in vivo*.
- 65

FIGURA 1

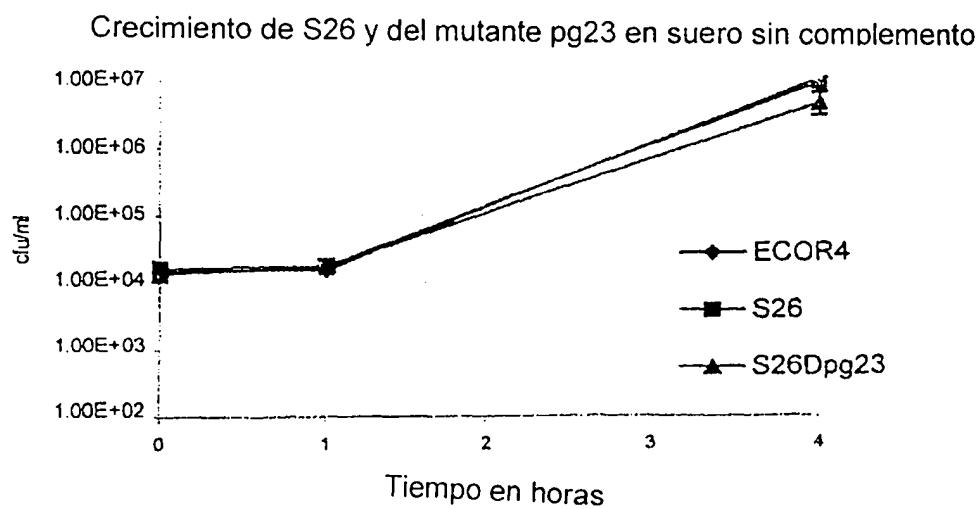
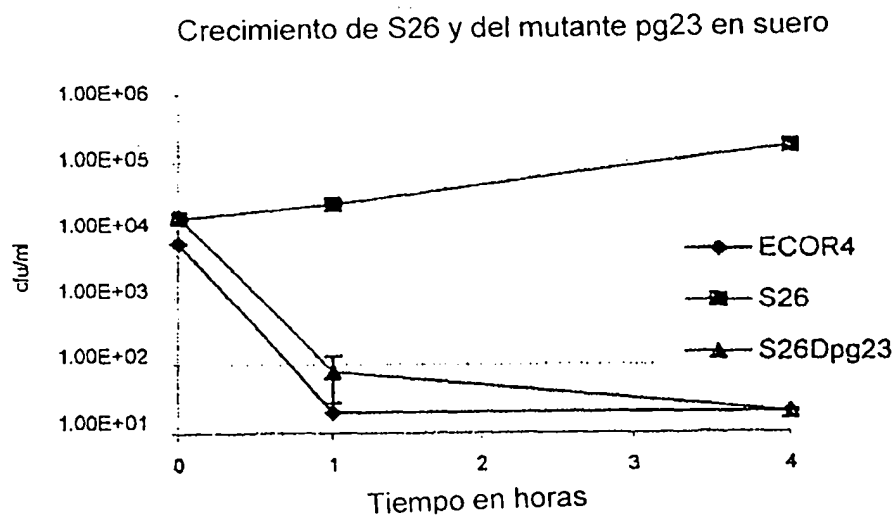


FIGURA 2

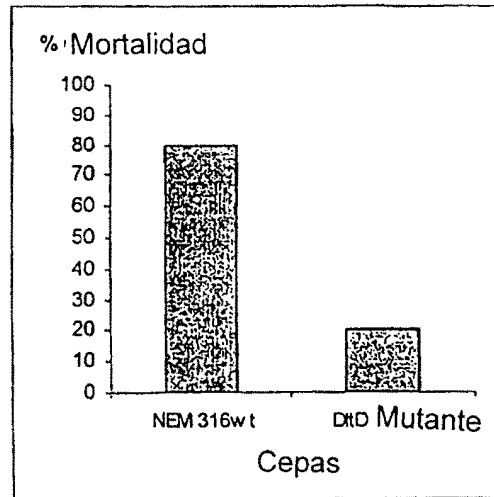


FIGURA 3

ES 2 306 891 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MUTABILIS S.A. se puede usar como
5 <120> Determinantes de la patogenicidad que se pueden usar como dianas para desarrollar medios para prevenir y controlar infecciones bacterianas y/o diseminación sistémica
<130> 1621
<160> 32
10 <170> Patente en versión 3.1
<210> 1
<211> 305
<212> PRT
15 <213> *Escherichia coli*

<400> 1
20 Pro Ala Leu Thr Asp Ala Gln Gln Ala Ile Pro Gly Ile Lys Phe Asp
1 5 10 15
Trp Val Val Glu Glu Gly Phe Ala Gln Ile Pro Ser Trp His Ala Ala
25 20 25 30
Val Glu Arg Val Ile Pro Val Ala Ile Arg Arg Trp Arg Lys Ala Trp
30 35 40 45
Phe Ser Ala Pro Ile Lys Ala Glu Arg Lys Ala Phe Arg Glu Ala Leu
50 55 60
35 Gln Ala Glu Asn Tyr Asp Ala Val Ile Asp Ala Gln Gly Leu Val Lys
65 70 75 80
Ser Ala Ala Leu Val Thr Arg Leu Ala His Gly Val Lys His Gly Leu
40 85 90 95
Asp Trp Gln Thr Ala Arg Glu Pro Leu Ala Ser Leu Phe Tyr Asn Cys
45 100 105 110
Lys His His Ile Ala Lys Gln Gln His Ala Val Glu Arg Thr Arg Glu
50 115 120 125
Leu Phe Ala Lys Ser Leu Gly Tyr Ser Lys Pro Gln Thr Gln Gly Asp
55 130 135 140
Tyr Ala Ile Ala Gln His Phe Leu Thr Asn Leu Pro Thr Asp Ala Gly
60 145 150 155 160
Glu Tyr Ala Val Phe Leu His Ala Thr Thr Arg Asp Asp Lys His Trp
65 165 170 175
Pro Glu Glu His Trp Arg Glu Leu Ile Gly Leu Leu Ala Asp Ser Gly
180 185 190
Ile Arg Ile Lys Leu Pro Trp Gly Ala Pro His Glu Glu Glu Arg Ala

ES 2 306 891 T3

Lys Arg Leu Ala Glu Gly Phe Ala Tyr Val Glu Val Leu Pro Lys Met
 210 215 220
 5 Ser Leu Glu Gly Val Ala Arg Val Leu Ala Gly Ala Lys Phe Val Val
 225 230 235 240
 10 Ser Val Asp Thr Gly Leu Ser His Leu Thr Ala Ala Leu Asp Arg Pro
 245 250 255
 15 Asn Ile Thr Val Tyr Gly Pro Thr Asp Pro Gly Leu Ile Gly Gly Tyr
 260 265 270
 20 Gly Lys Asn Gln Met Val Cys Arg Ala Pro Gly Asn Glu Leu Ser Gln
 275 280 285
 25 Leu Thr Ala Asn Ala Val Lys Arg Phe Ile Glu Glu Asn Ala Ala Met
 290 295 300
 30 Ile
 305
 <210> 2
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
 <400> 2
 35 Met Arg Phe His Gly Asp Met Leu Leu Thr Thr Pro Val Ile Ser Ser
 1 5 10 15
 40 Leu Lys Lys Asn Tyr Pro Asp Ala Lys Ile Asp Val Leu Leu Tyr Gln
 20 25 30
 45 Asp Thr Ile Pro Ile Leu Ser Glu Asn Pro Glu Ile Asn Ala Leu Tyr
 35 40 45
 50 Gly Ile Lys Asn Lys Lys Ala Lys Ala Ser Glu Lys Ile Ala Asn Phe
 50 55 60
 55 Phe His Leu Ile Lys Val Leu Arg Ala Asn Lys Tyr Asp Leu Ile Val
 65 70 75 80
 60 Asn Leu Thr Asp Gln Trp Met Val Ala Ile Leu Val Arg Leu Leu Asn
 85 90 95
 65 Ala Arg Val Lys Ile Ser Gln Asp Tyr His His Arg Gln Ser Ala Phe
 100 105 110
 70 Trp Arg Lys Ser Phe Thr His Leu Val Pro Leu Gln Gly Gly Asn Val
 115 120 125

ES 2 306 891 T3

5 Val Glu Ser Asn Leu Ser Val Leu Thr Pro Leu Gly Val Asp Ser Leu
130 135 140

10 Val Lys Gln Thr Thr Met Ser Tyr Pro Pro Ala Ser Trp Lys Arg Met
145 150 155 160

15 Arg Arg Glu Leu Asp His Ala Gly Val Gly Gln Asn Tyr Val Val Ile
165 170 175

20 Gln Pro Thr Ala Arg Gln Ile Phe Lys Cys Trp Asp Asn Ala Lys Phe
180 185 190

25 Ser Ala Val Ile Asp Ala Leu His Ala Arg Gly Tyr Glu Val Val Leu
195 200 205

30 Thr Ser Gly Pro Asp Lys Asp Asp Leu Ala Cys Val Asn Glu Ile Ala
210 215 220

35 Gln Gly Cys Gln Thr Pro Pro Val Thr Ala Leu Ala Gly Lys Val Thr
225 230 235 240

40 Phe Pro Glu Leu Gly Ala Leu Ile Asp His Ala Gln Leu Phe Ile Gly
245 250 255

45 Val Asp Ser Ala Pro Ala His Ile Ala Ala Ala Val Asn Thr Pro Leu
260 265 270

50 Ile Ser Leu Phe Gly Ala Thr Asp His Ile Phe Trp Arg Pro Trp Ser
275 280 285

55 Asn Asn Met Ile Gln Phe Trp Ala Gly Asp Tyr Arg Glu Met Pro Thr
290 295 300

60 Arg Asp Gln Arg Asp Arg Asn Glu Met Tyr Leu Ser Val Ile Pro Ala
305 310 315 320

65 Ala Asp Val Ile Ala Ala Val Asp Lys Leu Leu Pro Ser Ser Thr Thr
325 330 335

70 Gly Thr Ser Leu
340

75 <210> 3
<211> 265
<212> PRT
<213> *Escherichia coli*

80 <400> 3

85 Met Val Glu Leu Lys Glu Pro Phe Ala Thr Leu Trp Arg Gly Lys Asp
1 5 10 15

ES 2 306 891 T3

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

<210> 4

<211> 374

65 <212> PRT

<213> *Escherichia coli*

ES 2 306 891 T3

<400> 4

5 Met Ile Val Ala Phe Cys Leu Tyr Lys Tyr Phe Pro Phe Gly Gly Leu
1 5 10 15

10 Gln Arg Asp Phe Met Arg Ile Ala Gln Thr Val Ala Ala Arg Gly His
20 30

15 His Val Arg Val Tyr Thr Gln Ser Trp Glu Gly Glu Cys Pro Asp Val
35 40 45

20 Phe Glu Leu Ile Lys Val Pro Val Lys Ser His Thr Asn His Gly Arg
50 55 60

25 Asn Ala Glu Tyr Phe Ala Trp Val Gln Lys His Leu Arg Glu His Pro
65 70 75 80

30 Val Asp Lys Val Val Gly Phe Asn Lys Met Pro Gly Leu Asp Val Tyr
85 90 95

35 Tyr Ala Ala Asp Val Cys Tyr Ala Glu Lys Val Ala Gln Glu Lys Gly
100 105 110

40 Phe Phe Tyr Arg Leu Thr Ser Arg Tyr Arg His Tyr Ala Ala Phe Glu
115 120 125

45 Arg Ala Thr Phe Glu Gln Gly Lys Pro Thr Gln Leu Leu Met Leu Thr
130 135 140

50 Asp Lys Gln Ile Ala Asp Phe Gln Lys His Tyr Gln Thr Glu Ala Glu
145 150 155 160

55 Arg Phe His Ile Leu Pro Pro Gly Ile Tyr Pro Asp Arg Lys Tyr Ser
165 170 175

60 Gln Gln Pro Ala Asn Ser Arg Glu Ile Phe Arg Lys Lys Asn Gly Ile
180 185 190

65 Thr Glu Gln Gln Tyr Leu Leu Leu Gln Val Gly Ser Asp Phe Thr Arg
195 200 205

Lys Gly Val Asp Arg Ser Ile Glu Ala Leu Ala Ser Leu Pro Asp Ser
210 215 220

Leu Arg His Asn Thr Leu Leu Tyr Val Val Gly Gln Asp Lys Pro Arg
225 230 235 240

65 Lys Phe Glu Ala Leu Ala Glu Lys Arg Gly Val Arg Ser Asn Val His

ES 2 306 891 T3

				245					250					255		
5	Phe	Phe	Ser	Gly	Arg	Asn	Asp	Val	Ser	Glu	Leu	Met	Ala	Ala	Ala	Asp
				260					265					270		
	Leu	Leu	Leu	His	Pro	Ala	Tyr	Gln	Glu	Ala	Ala	Gly	Ile	Val	Leu	Leu
			275					280					285			
10	Glu	Ala	Ile	Thr	Ala	Gly	Leu	Pro	Val	Leu	Thr	Thr	Ala	Val	Cys	Gly
		290					295					300				
15	Tyr	Ala	His	Tyr	Ile	Val	Asp	Ala	Asn	Cys	Gly	Glu	Ala	Ile	Ala	Glu
	305					310					315					320
	Pro	Phe	Arg	Gln	Glu	Thr	Leu	Asn	Glu	Ile	Leu	Arg	Lys	Ala	Leu	Thr
				325						330					335	
20	Gln	Ser	Ser	Leu	Arg	Gln	Ala	Trp	Ala	Glu	Asn	Ala	Arg	His	Tyr	Ala
				340					345					350		
25	Asp	Thr	Gln	Asp	Leu	Tyr	Ser	Leu	Pro	Glu	Lys	Ala	Ala	Asp	Ile	Ile
			355					360					365			
	Thr	Gly	Gly	Leu	Asp	Gly										
			370													
30	<210> 5															
	<211> 348															
	<212> PRT															
35	<213> <i>Escherichia coli</i>															
	<400> 5															
40	Met	Lys	Ile	Leu	Val	Ile	Gly	Pro	Ser	Trp	Val	Gly	Asp	Met	Met	Met
	1				5					10					15	
	Ser	Gln	Ser	Leu	Tyr	Arg	Thr	Leu	Gln	Ala	Arg	Tyr	Pro	Gln	Ala	Ile
45				20					25					30		
	Ile	Asp	Val	Met	Ala	Pro	Ala	Trp	Cys	Arg	Pro	Leu	Leu	Ser	Arg	Met
			35					40					45			
50	Pro	Glu	Val	Asn	Glu	Ala	Ile	Pro	Met	Pro	Leu	Gly	His	Gly	Ala	Leu
		50					55					60				
55	Glu	Ile	Gly	Glu	Arg	Arg	Lys	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Arg	Glu	Lys	Arg
	65					70					75					80
	Tyr	Asp	Arg	Ala	Tyr	Val	Leu	Pro	Asn	Ser	Phe	Lys	Ser	Ala	Leu	Val
60				85						90					95	
	Pro	Phe	Phe	Ala	Gly	Ile	Pro	His	Arg	Thr	Gly	Trp	Arg	Gly	Glu	Met
65																

ES 2 306 891 T3

	100	105	110
5	Arg Tyr Gly 115	Leu Leu Asn Asp Val 120	Arg Val Leu Asp Lys Glu Ala Trp 125
10	Pro Leu Met 130	Val Glu Arg Tyr Ile Ala Leu Ala Tyr Asp Lys Gly Ile 135	140
15	Met Arg Thr Ala Gln Asp Leu Pro Gln Pro Leu Leu Trp Pro Gln Leu 145	150	155
20	Gln Val Ser Glu Gly Glu Lys Ser Tyr Thr Cys Asn Gln Phe Ser Leu 165	170	175
25	Ser Ser Glu Arg Pro Met Ile Gly Phe Cys Pro Gly Ala Glu Phe Gly 180	185	190
30	Pro Ala Lys Arg Trp Pro His Tyr His Tyr Ala Glu Leu Ala Lys Gln 195	200	205
35	Leu Ile Asp Glu Gly Tyr Gln Val Val Leu Phe Gly Ser Ala Lys Asp 210	215	220
40	His Glu Ala Gly Asn Glu Ile Leu Ala Ala Leu Asn Thr Glu Gln Gln 225	230	235
45	Ala Trp Cys Arg Asn Leu Ala Gly Glu Thr Gln Leu Asp Gln Ala Val 245	250	255
50	Ile Leu Ile Ala Ala Cys Lys Ala Ile Val Thr Asn Asp Ser Gly Leu 260	265	270
55	Met His Val Ala Ala Ala Leu Asn Arg Pro Leu Val Ala Leu Tyr Gly 275	280	285
60	Pro Ser Ser Pro Asp Phe Thr Pro Pro Leu Ser His Lys Ala Arg Val 290	295	300
65	Ile Arg Leu Ile Thr Gly Tyr His Lys Val Arg Lys Gly Asp Ala Ala 305	310	315
70	Glu Gly Tyr His Gln Ser Leu Ile Asp Ile Thr Pro Gln Arg Val Leu 325	330	335
75	Glu Glu Leu Asn Ala Leu Leu Leu Gln Glu Glu Ala 340	345	

<210> 6

60 <211> 338

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

65

ES 2 306 891 T3

<400> 6

5 Met Ser Ala His Tyr Phe Asn Pro Gln Glu Met Ile Asn Lys Thr Ile
1 5 10 15

10 Ile Phe Asp Glu Arg Pro Ala Ala Ser Val Ala Ser Ser Phe His Val
20 25 30

15 Ala Tyr Gly Ile Asp Lys Asn Phe Leu Phe Gly Cys Gly Val Ser Ile
35 40 45

20 Thr Ser Val Leu Leu His Asn Asn Asp Val Ser Phe Val Phe His Val
50 55 60

25 Phe Ile Asp Asp Ile Pro Glu Ala Asp Ile Gln Arg Leu Ala Gln Leu
65 70 75 80

30 Ala Lys Ser Tyr Arg Thr Cys Ile Gln Ile His Leu Val Asn Cys Glu
85 90 95

35 Arg Leu Lys Ala Leu Pro Thr Thr Lys Asn Trp Ser Ile Ala Met Tyr
100 105 110

40 Phe Arg Phe Val Ile Ala Asp Tyr Phe Ile Asp Gln Gln Asp Lys Ile
115 120 125

45 Leu Tyr Leu Asp Ala Asp Ile Ala Cys Gln Gly Asn Leu Lys Pro Leu
130 135 140

50 Ile Thr Met Asp Leu Ala Asn Asn Val Ala Ala Val Val Thr Glu Arg
145 150 155 160

55 Asp Ala Asn Trp Trp Ser Leu Arg Gly Gln Ser Leu Gln Cys Asn Glu
165 170 175

60 Leu Glu Lys Gly Tyr Phe Asn Ser Gly Val Leu Leu Ile Asn Thr Leu
180 185 190

65 Ala Trp Ala Gln Glu Ser Val Ser Ala Lys Ala Met Ser Met Leu Ala
195 200 205

70 Asp Lys Ala Ile Val Ser Arg Leu Thr Tyr Met Asp Gln Asp Ile Leu
210 215 220

75 Asn Leu Ile Leu Leu Gly Lys Val Lys Phe Ile Asp Ala Lys Tyr Asn
225 230 235 240

80 Thr Gln Phe Ser Leu Asn Tyr Glu Leu Lys Lys Ser Phe Val Cys Pro
245 250 255

ES 2 306 891 T3

Ile Asn Asp Glu Thr Val Leu Ile His Tyr Val Gly Pro Thr Lys Pro
 260 265 270

5

Trp His Tyr Trp Ala Gly Tyr Pro Ser Ala Gln Pro Phe Ile Lys Ala
 275 280 285

10

Lys Glu Ala Ser Pro Trp Lys Asn Glu Pro Leu Met Arg Pro Val Asn
 290 295 300

15

Ser Asn Tyr Ala Arg Tyr Cys Ala Lys His Asn Phe Lys Gln Asn Lys
 305 310 315 320

20

Pro Ile Asn Gly Ile Met Asn Tyr Ile Tyr Tyr Phe Tyr Leu Lys Ile
 325 330 335

Ile Lys

<210> 7

<211> 302

25 <212> PRT

<213> *Escherichia coli*

30 <400> 7

Met Ala Ala Ile Asn Thr Lys Val Lys Lys Ala Val Ile Pro Val Ala
 1 5 10 15

35

Gly Leu Gly Thr Arg Met Leu Pro Ala Thr Lys Ala Ile Pro Lys Glu
 20 25 30

40

Met Leu Pro Leu Val Asp Lys Pro Leu Ile Gln Tyr Val Val Asn Glu
 35 40 45

45

Cys Ile Ala Ala Gly Ile Thr Glu Ile Val Leu Val Thr His Ser Ser
 50 55 60

50

Lys Asn Ser Ile Glu Asn His Phe Asp Thr Ser Phe Glu Leu Glu Ala
 65 70 75 80

55

Met Leu Glu Lys Arg Val Lys Arg Gln Leu Leu Asp Glu Val Gln Ser
 85 90 95

60

Ile Cys Pro Pro His Val Thr Ile Met Gln Val Arg Gln Gly Leu Ala
 100 105 110

65

Lys Gly Leu Gly His Ala Val Leu Cys Ala His Pro Val Val Gly Asp
 115 120 125

Glu Pro Val Ala Val Ile Leu Pro Asp Val Ile Leu Asp Glu Tyr Glu
 130 135 140

ES 2 306 891 T3

Ser Asp Leu Ser Gln Asp Asn Leu Ala Glu Met Ile Arg Arg Phe Asp
 145 150 155 160
 5
 Glu Thr Gly His Ser Gln Ile Met Val Glu Pro Val Ala Asp Val Thr
 165 170 175
 10
 Ala Tyr Gly Val Val Asp Cys Lys Gly Val Glu Leu Ala Pro Gly Glu
 180 185 190
 15
 Ser Val Pro Met Val Gly Val Val Glu Lys Pro Lys Ala Asp Val Ala
 195 200 205
 20
 Pro Ser Asn Leu Ala Ile Val Gly Arg Tyr Val Leu Ser Ala Asp Ile
 210 215 220
 25
 Trp Pro Leu Leu Ala Lys Thr Pro Pro Gly Ala Gly Asp Glu Ile Gln
 225 230 235 240
 30
 Leu Thr Asp Ala Ile Asp Met Leu Ile Glu Lys Glu Thr Val Glu Ala
 245 250 255
 35
 Tyr His Met Lys Gly Lys Ser His Asp Cys Gly Asn Lys Leu Gly Tyr
 260 265 270
 40
 Met Gln Ala Phe Val Glu Tyr Gly Ile Arg His Asn Thr Leu Gly Thr
 275 280 285
 45
 Glu Phe Lys Ala Trp Leu Glu Glu Glu Met Gly Ile Lys Lys
 290 295 300
 <210> 8
 <211> 546
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
 50
 Met Ala Ile His Asn Arg Ala Gly Gln Pro Ala Gln Gln Ser Asp Leu
 1 5 10 15
 55
 Ile Asn Val Ala Gln Leu Thr Ala Gln Tyr Tyr Val Leu Lys Pro Glu
 20 25 30
 60
 Ala Gly Asn Ala Glu His Ala Val Lys Phe Gly Thr Ser Gly His Arg
 35 40 45
 65
 Gly Ser Ala Ala Arg His Ser Phe Asn Glu Pro His Ile Leu Ala Ile
 50 55 60
 70
 Ala Gln Ala Ile Ala Glu Arg Ala Lys Asn Gly Ile Thr Gly Pro
 65 70 75 80

ES 2 306 891 T3

	340	345	350	
5	Ala Met Ile Asp Arg Val Val Asn Asp Leu Gly Arg Lys Leu Val Glu 355 360 365			
10	Val Pro Val Gly Phe Lys Trp Phe Val Asp Gly Leu Phe Asp Gly Ser 370 375 380			
15	Phe Gly Phe Gly Gly Glu Glu Ser Ala Gly Ala Ser Phe Leu Arg Phe 385 390 400			
20	Asp Gly Thr Pro Trp Ser Thr Asp Lys Asp Gly Ile Ile Met Cys Leu 405 410 415			
25	Leu Ala Ala Glu Ile Thr Ala Val Thr Gly Lys Asn Pro Gln Glu His 420 425 430			
30	Tyr Asn Glu Leu Ala Lys Arg Phe Gly Ala Pro Ser Tyr Asn Arg Leu 435 440 445			
35	Gln Ala Ala Ala Thr Ser Ala Gln Lys Ala Ala Leu Ser Lys Leu Ser 450 455 460			
40	Pro Glu Met Val Ser Ala Ser Thr Leu Ala Gly Asp Pro Ile Thr Ala 465 470 475 480			
45	Arg Leu Thr Ala Ala Pro Gly Asn Gly Ala Ser Ile Gly Gly Leu Lys 485 490 495			
50	Val Met Thr Asp Asn Gly Trp Phe Ala Ala Arg Pro Ser Gly Thr Glu 500 505 510			
55	Asp Ala Tyr Lys Ile Tyr Cys Glu Ser Phe Leu Gly Glu Glu His Arg 515 520 525			
60	Lys Gln Ile Glu Lys Glu Ala Val Glu Ile Val Ser Glu Val Leu Lys 530 535 540			
65	Asn Ala 545			
	<210> 9			
	<211> 558			
	<212> PRT			
	<213> <i>Escherichia coli</i>			
	<400> 9			
	Met Lys Leu Phe Lys Ser Ile Leu Leu Ile Ala Ala Cys His Ala Ala 1 5 10 15			
	Gln Ala Ser Ala Ala Ile Asp Ile Asn Ala Asp Pro Asn Leu Thr Gly			

ES 2 306 891 T3

	20					25					30					
5	Ala	Ala	Pro	Leu	Thr	Gly	Ile	Leu	Asn	Gly	Gln	Gln	Ser	Asp	Thr	Gln
			35					40					45			
10	Asn	Met	Ser	Gly	Phe	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro	Val	Val
		50					55					60				
15	Met	Ser	Arg	Met	Phe	Gly	Ala	Gln	Leu	Phe	Asn	Gly	Thr	Ser	Ala	Asp
	65					70					75				80	
20	Ser	Gly	Ala	Thr	Val	Gly	Phe	Asn	Pro	Asp	Tyr	Ile	Leu	Asn	Pro	Gly
					85					90					95	
25	Asp	Ser	Ile	Gln	Val	Arg	Leu	Trp	Gly	Ala	Phe	Thr	Phe	Asp	Gly	Ala
				100					105					110		
30	Leu	Gln	Val	Asp	Pro	Lys	Gly	Asn	Ile	Phe	Leu	Pro	Asn	Val	Gly	Pro
			115					120					125			
35	Val	Lys	Val	Ala	Gly	Val	Ser	Asn	Ser	Gln	Leu	Asn	Ala	Leu	Val	Thr
		130					135					140				
40	Ser	Lys	Val	Lys	Glu	Val	Tyr	Gln	Ser	Asn	Val	Asn	Val	Tyr	Ala	Ser
	145					150					155				160	
45	Leu	Leu	Gln	Ala	Gln	Pro	Val	Lys	Val	Tyr	Val	Thr	Gly	Phe	Val	Arg
					165					170					175	
50	Asn	Pro	Gly	Leu	Tyr	Gly	Gly	Val	Thr	Ser	Asp	Ser	Leu	Leu	Asn	Tyr
				180					185					190		
55	Leu	Ile	Lys	Ala	Gly	Gly	Val	Asp	Pro	Glu	Arg	Gly	Ser	Tyr	Val	Asp
			195					200					205			
60	Ile	Val	Val	Lys	Arg	Gly	Asn	Arg	Val	Arg	Ser	Asn	Val	Asn	Leu	Tyr
		210					215					220				
65	Asp	Phe	Leu	Leu	Asn	Gly	Lys	Leu	Gly	Leu	Ser	Gln	Phe	Ala	Asp	Gly
	225					230					235				240	
70	Asp	Thr	Ile	Ile	Val	Gly	Pro	Arg	Gln	His	Thr	Phe	Ser	Val	Gln	Gly
					245					250					255	
75	Asp	Val	Phe	Asn	Ser	Tyr	Asp	Phe	Glu	Phe	Arg	Glu	Ser	Ser	Ile	Pro
				260					265					270		
80	Val	Thr	Glu	Ala	Leu	Ser	Trp	Ala	Arg	Pro	Lys	Pro	Gly	Ala	Thr	His
			275					280					285			

ES 2 306 891 T3

Ile Thr Ile Met Arg Lys Gln Gly Leu Gln Lys Arg Ser Glu Tyr Tyr
 290 295 300
 5
 Pro Ile Ser Ser Ala Pro Gly Arg Met Leu Gln Asn Gly Asp Thr Leu
 305 310 315 320
 10
 Ile Val Ser Thr Asp Arg Tyr Ala Gly Thr Ile Gln Val Arg Val Glu
 325 330 335
 15
 Gly Ala His Ser Gly Glu His Ala Met Val Leu Pro Tyr Gly Ser Thr
 340 345 350
 20
 Met Arg Ala Val Leu Glu Lys Val Arg Pro Asn Ser Met Ser Gln Met
 355 360 365
 25
 Asn Ala Val Gln Leu Tyr Arg Pro Ser Val Ala Gln Arg Gln Lys Glu
 370 375 380
 30
 Met Leu Asn Leu Ser Leu Gln Lys Leu Glu Glu Ala Ser Leu Ser Ala
 385 390 395 400
 35
 Gln Ser Ser Thr Lys Glu Glu Ala Ser Leu Arg Met Gln Glu Ala Gln
 405 410 415
 40
 Leu Ile Ser Arg Phe Val Ala Lys Ala Arg Thr Val Val Pro Lys Gly
 420 425 430
 45
 Glu Val Ile Leu Asn Glu Ser Asn Ile Asp Ser Val Leu Leu Glu Asp
 435 440 445
 50
 Gly Asp Val Ile Asn Ile Pro Glu Lys Thr Ser Leu Val Met Val His
 450 455 460
 55
 Gly Glu Val Leu Phe Pro Asn Ala Val Ser Trp Gln Lys Gly Met Thr
 465 470 475 480
 60
 Thr Glu Asp Tyr Ile Glu Lys Cys Gly Gly Leu Thr Gln Lys Ser Gly
 485 490 495
 65
 Asn Ala Arg Ile Ile Val Ile Arg Gln Asn Gly Ala Ala Val Asn Ala
 500 505 510
 70
 Glu Asp Val Asp Ser Leu Lys Pro Gly Asp Glu Ile Met Val Leu Pro
 515 520 525
 75
 Lys Tyr Glu Ser Lys Asn Ile Glu Val Thr Arg Gly Ile Ser Thr Ile
 530 535 540
 80
 Leu Tyr Gln Leu Ala Val Gly Ala Lys Val Ile Leu Ser Leu
 545 550 555

ES 2 306 891 T3

<210> 10

<211> 207

<212> PRT

5 <213> *Escherichia coli*

<400> 10

10 Met Ser Lys Lys Leu Ile Ile Phe Gly Ala Gly Gly Phe Ser Lys Ser
1 5 10 15

15 Ile Ile Asp Ser Leu Asn His Lys His Tyr Glu Leu Ile Gly Phe Ile
20 25 30

20 Asp Lys Tyr Lys Ser Gly Tyr His Gln Ser Tyr Pro Ile Leu Gly Asn
35 40 45

25 Asp Ile Ala Asp Ile Glu Asn Lys Asp Asn Tyr Tyr Tyr Phe Ile Gly
50 55 60

30 Ile Gly Lys Pro Ser Thr Arg Lys His Tyr Leu Asn Ile Ile Arg Lys
65 70 75 80

35 His Asn Leu Arg Leu Ile Asn Ile Ile Asp Lys Thr Ala Ile Leu Ser
85 90 95

40 Pro Asn Ile Ile Leu Gly Asp Gly Ile Phe Ile Gly Lys Met Cys Ile
100 105 110

45 Leu Asn Arg Asp Thr Arg Ile His Asp Ala Val Val Ile Asn Thr Arg
115 120 125

50 Ser Leu Ile Glu His Gly Asn Glu Ile Gly Cys Cys Ser Asn Ile Ser
130 135 140

55 Thr Asn Val Val Leu Asn Gly Asp Val Ser Val Gly Glu Glu Thr Phe
145 150 155 160

60 Val Gly Ser Val Thr Val Val Asn Gly Gln Leu Lys Leu Gly Ser Lys
165 170 175

65 Ser Ile Ile Gly Ser Gly Ser Val Val Ile Arg Asn Ile Pro Ser Asn
180 185 190

70 Val Val Val Ala Gly Thr Pro Thr Arg Leu Ile Arg Gly Asn Glu
195 200 205

<210> 11

<211> 191

<212> PRT

65 <213> *Escherichia coli*

ES 2 306 891 T3

<400> 11

5 Met Ala Lys Ser Val Pro Ala Ile Phe Leu Asp Arg Asp Gly Thr Ile
1 5 10 15

Asn Val Asp His Gly Tyr Val His Glu Ile Asp Asn Phe Glu Phe Ile
20 25 30

10 Asp Gly Val Ile Asp Ala Met Arg Glu Leu Lys Lys Met Gly Phe Ala
35 40 45

15 Leu Val Val Val Thr Asn Gln Ser Gly Ile Ala Arg Gly Lys Phe Thr
50 55 60

Glu Ala Gln Phe Glu Thr Leu Thr Glu Trp Met Asp Trp Ser Leu Ala
65 70 75 80

20 Asp Arg Asp Val Asp Leu Asp Gly Ile Tyr Tyr Cys Pro His His Pro
85 90 95

25 Gln Gly Ser Val Glu Glu Phe Arg Gln Val Cys Asp Cys Arg Lys Pro
100 105 110

30 His Pro Gly Met Leu Leu Ser Ala Arg Asp Tyr Leu His Ile Asp Met
115 120 125

35 Ala Ala Ser Tyr Met Val Gly Asp Lys Leu Glu Asp Met Gln Ala Ala
130 135 140

40 Val Ala Ala Asn Val Gly Thr Lys Val Leu Val Arg Thr Gly Lys Pro
145 150 155 160

Ile Thr Pro Glu Ala Glu Asn Ala Ala Asp Trp Val Leu Asn Ser Leu
165 170 175

45 Ala Asp Leu Pro Gln Ala Ile Lys Lys Gln Gln Lys Pro Ala Gln
180 185 190

<210> 12

<211> 310

50 <212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<400> 12

55 Met Ile Ile Val Thr Gly Gly Ala Gly Phe Ile Gly Ser Asn Ile Val
1 5 10 15

60 Lys Ala Leu Asn Asp Lys Gly Ile Thr Asp Ile Leu Val Val Asp Asn
20 25 30

Leu Lys Asp Gly Thr Lys Phe Val Asn Leu Val Asp Leu Asn Ile Ala
35 40 45

65

ES 2 306 891 T3

Asp Tyr Met Asp Lys Glu Asp Phe Leu Ile Gln Ile Met Ala Gly Glu
 50 55 60
 5 Glu Phe Gly Asp Val Glu Ala Ile Phe His Glu Gly Ala Cys Ser Ser
 65 70 75 80
 10 Thr Thr Glu Trp Asp Gly Lys Tyr Met Met Asp Asn Asn Tyr Gln Tyr
 85 90 95
 15 Ser Lys Glu Leu Leu His Tyr Cys Leu Glu Arg Glu Ile Pro Phe Leu
 100 105 110
 20 Tyr Ala Ser Ser Ala Ala Thr Tyr Gly Gly Arg Thr Ser Asp Phe Ile
 115 120 125
 25 Glu Ser Arg Glu Tyr Glu Lys Pro Leu Asn Val Tyr Gly Tyr Ser Lys
 130 135 140
 30 Phe Leu Phe Asp Glu Tyr Val Arg Gln Ile Leu Pro Glu Ala Asn Ser
 145 150 155 160
 35 Gln Ile Val Gly Phe Arg Tyr Phe Asn Val Tyr Gly Pro Arg Glu Gly
 165 170 175
 40 His Lys Gly Ser Met Ala Ser Val Ala Phe His Leu Asn Thr Gln Leu
 180 185 190
 45 Asn Asn Gly Glu Ser Pro Lys Leu Phe Glu Gly Ser Glu Asn Phe Lys
 195 200 205
 50 Arg Asp Phe Val Tyr Val Gly Asp Val Ala Asp Val Asn Leu Trp Phe
 210 215 220
 55 Leu Glu Asn Gly Val Ser Gly Ile Phe Asn Leu Gly Thr Gly Arg Ala
 225 230 235 240
 60 Glu Ser Phe Gln Ala Val Ala Asp Ala Thr Leu Ala Tyr His Lys Lys
 245 250 255
 65 Gly Gln Ile Glu Tyr Ile Pro Phe Pro Asp Lys Leu Lys Gly Arg Tyr
 260 265 270
 70 Gln Ala Phe Thr Gln Ala Asp Leu Thr Asn Leu Arg Ala Ala Gly Tyr
 275 280 285
 75 Asp Lys Pro Phe Lys Thr Val Ala Glu Gly Val Thr Glu Tyr Met Ala
 290 295 300
 80 Trp Leu Asn Arg Asp Ala

<210> 13

65 <211> 477

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

ES 2 306 891 T3

<400> 13

5 Met Lys Val Thr Leu Pro Glu Phe Glu Arg Ala Gly Val Met Val Val
1 5 10 15

10 Gly Asp Val Met Leu Asp Arg Tyr Trp Tyr Gly Pro Thr Ser Arg Ile
20 25 30

15 Ser Pro Glu Ala Pro Val Pro Val Val Lys Val Asn Thr Ile Glu Glu
35 40 45

20 Arg Pro Gly Gly Ala Ala Asn Val Ala Met Asn Ile Ala Ser Leu Gly
50 55 60

25 Ala Asn Ala Arg Leu Val Gly Leu Thr Gly Ile Asp Asp Ala Ala Arg
65 70 75 80

30 Ala Leu Ser Lys Ser Leu Ala Asp Val Asn Val Lys Cys Asp Phe Val
85 90 95

35 Ser Val Pro Thr His Pro Thr Ile Thr Lys Leu Arg Val Leu Ser Arg
100 105 110

40 Asn Gln Gln Leu Ile Arg Leu Asp Phe Glu Glu Gly Phe Glu Gly Val
115 120 125

45 Asp Pro Gln Pro Leu His Glu Arg Ile Asn Gln Ala Leu Ser Ser Ile
130 135 140

50 Gly Ala Leu Val Leu Ser Asp Tyr Ala Lys Gly Ala Leu Ala Ser Val
145 150 155 160

55 Gln Gln Met Ile Gln Leu Ala Arg Lys Ala Gly Val Pro Val Leu Ile
165 170 175

60 Asp Pro Lys Gly Thr Asp Phe Glu Arg Tyr Arg Gly Ala Thr Leu Leu
180 185 190

65 Thr Pro Asn Leu Ser Glu Phe Glu Ala Val Val Gly Lys Cys Lys Thr
195 200 205

70 Glu Glu Glu Ile Val Glu Arg Gly Met Lys Leu Ile Ala Asp Tyr Glu
210 215 220

75 Leu Ser Ala Leu Leu Val Thr Arg Ser Glu Gln Gly Met Ser Leu Leu

ES 2 306 891 T3

225 230 235 240
 Gln Pro Gly Lys Ala Pro Leu His Met Pro Thr Gln Ala Gln Glu Val
 245 250 255
 Tyr Asp Val Thr Gly Ala Gly Asp Thr Val Ile Gly Val Leu Ala Ala
 260 265 270
 Thr Leu Ala Ala Gly Asn Ser Leu Glu Glu Ala Cys Phe Phe Ala Asn
 275 280 285
 Ala Ala Ala Gly Val Val Val Gly Lys Leu Gly Thr Ser Thr Val Ser
 290 295 300
 Pro Ile Glu Leu Glu Asn Ala Val Arg Gly Arg Ala Asp Thr Gly Phe
 305 310 315 320
 Gly Val Met Thr Glu Glu Glu Leu Lys Leu Ala Val Ala Ala Ala Arg
 325 330 335
 Lys Arg Gly Glu Lys Val Val Met Thr Asn Gly Val Phe Asp Ile Leu
 340 345 350
 His Ala Gly His Val Ser Tyr Leu Ala Asn Ala Arg Lys Leu Gly Asp
 355 360 365
 Arg Leu Ile Val Ala Val Asn Ser Asp Ala Ser Thr Lys Arg Leu Lys
 370 375 380
 Gly Asp Ser Arg Pro Val Asn Pro Leu Glu Gln Arg Met Ile Val Leu
 385 390 395 400
 Gly Ala Leu Glu Ala Val Asp Trp Val Val Ser Phe Glu Glu Asp Thr
 405 410 415
 Pro Gln Arg Leu Ile Ala Gly Ile Leu Pro Asp Leu Leu Val Lys Gly
 420 425 430
 Gly Asp Tyr Lys Pro Glu Glu Ile Ala Gly Ser Lys Glu Val Trp Ala
 435 440 445
 Asn Gly Gly Glu Val Leu Val Leu Asn Phe Glu Asp Gly Cys Ser Thr
 450 455 460
 Thr Asn Ile Ile Lys Lys Ile Gln Gln Asp Lys Lys Gly
 465 470 475

60 <210> 14
 <211> 420
 <212> PRT
 65 <213> *Escherichia coli*

ES 2 306 891 T3

<400> 14

5 Met Leu Lys Arg Leu Gly Lys Val Phe Gly Pro Leu Val Cys Ala Leu
1 1 5 10 15

10 Leu Leu Leu Val Gly Leu Tyr Leu Val Phe Pro Val Ser Gln Pro His
20 20 25 30

15 His Leu Gly Lys Glu Lys Asn Ser Ala Val Ala Leu Thr Lys Ala Gly
35 40 45

20 Phe Lys Ser Arg Val Gln Lys Val Arg Ala Phe Ser Asp Pro Lys Ala
50 55 60

25 Asn Phe Val Pro Phe Phe Gly Ser Ser Glu Trp Leu Arg Phe Asp Ala
65 70 75 80

30 Met His Pro Ser Val Leu Ala Glu Ala Tyr Lys Arg Pro Tyr Ile Pro
85 90 95

35 Tyr Leu Leu Gly Gln Lys Gly Ala Ala Ser Leu Thr Gln Tyr Tyr Gly
100 105 110

40 Ile Gln Gln Ile Lys Gly Gln Ile Lys Asn Lys Lys Ala Ile Tyr Val
115 120 125

45 Ile Ser Pro Gln Trp Phe Val Arg Lys Gly Ala Asn Lys Gly Ala Phe
130 135 140

50 Gln Asn Tyr Phe Ser Asn Asp Gln Thr Ile Arg Phe Leu Gln Asn Gln
145 150 155 160

55 Thr Gly Thr Thr Tyr Asp Arg Tyr Ala Ala Arg Arg Leu Leu Lys Leu
165 170 175

60 Tyr Pro Glu Ala Ser Met Ser Asp Leu Ile Glu Lys Val Ala Asp Gly
180 185 190

65 Gln Lys Leu Ser Asn Lys Asp Lys Gln Arg Leu Lys Phe Asn Asp Trp
195 200 205

70 Val Phe Glu Lys Thr Asp Ala Ile Phe Ser Tyr Leu Pro Leu Gly Lys
210 215 220

75 Thr Tyr Asn Gln Val Ile Met Pro His Val Gly Lys Leu Pro Lys Ala
225 230 235 240

80 Phe Ser Tyr Asn His Leu Ser Arg Ile Ala Ser Gln Asp Ala Lys Val
245 250 255

ES 2 306 891 T3

5 Ala Thr Arg Ser Asn Gln Phe Gly Ile Asp Asp Arg Phe Tyr Gln Thr
 260 265 270
 Arg Ile Lys Lys His Leu Lys Lys Leu Lys Gly Ser Gln Arg His Phe
 275 280 285
 10 Asn Tyr Thr Lys Ser Pro Glu Phe Asn Asp Leu Gln Leu Val Leu Asn
 290 295 300
 Glu Phe Ser Lys Gln Asn Thr Asp Val Leu Phe Val Ile Pro Pro Val
 305 310 315 320
 15 Asn Lys Lys Trp Thr Asp Tyr Thr Gly Leu Asp Gln Lys Met Tyr Gln
 325 330 335
 20 Lys Ser Val Glu Lys Ile Lys His Gln Leu Gln Ser Gln Gly Phe Asn
 340 345 350
 25 His Ile Ser Asp Leu Ser Arg Asp Gly Gly Lys Pro Tyr Phe Met Gln
 355 360 365
 30 Asp Thr Ile His Leu Gly Trp Asn Gly Trp Leu Glu Leu Asp Lys His
 370 375 380
 Ile Asn Pro Phe Leu Thr Glu Glu Asn Ser Lys Pro Asn Tyr His Ile
 385 390 395 400
 35 Asn Asn Lys Phe Leu Lys Arg Ser Trp Ala Lys Tyr Thr Gly Arg Pro
 405 410 415
 40 Ser Asp Tyr Lys
 420
 <210> 15
 <211> 511
 45 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*
 <400> 15
 50 Met Ile His Asp Met Ile Lys Thr Ile Glu His Phe Ala Glu Thr Gln
 1 5 10 15
 55 Ala Asp Phe Pro Val Tyr Asp Ile Leu Gly Glu Val His Thr Tyr Gly
 20 25 30
 60 Gln Leu Lys Val Asp Ser Asp Ser Leu Ala Ala His Ile Asp Ser Leu
 35 40 45
 65 Gly Leu Val Glu Lys Ser Pro Val Leu Val Phe Gly Gly Gln Glu Tyr
 50 55 60

ES 2 306 891 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

Glu Met Leu Ala Thr Phe Val Ala Leu Thr Lys Ser Gly His Ala Tyr
 65 70 75 80
 Ile Pro Val Asp Gln His Ser Ala Leu Asp Arg Ile Gln Ala Ile Met
 85 90 95
 Thr Val Ala Gln Pro Ser Leu Ile Ile Ser Ile Gly Glu Phe Pro Leu
 100 105 110
 Glu Val Asp Asn Val Pro Ile Leu Asp Val Ser Gln Val Ser Ala Ile
 115 120 125
 Phe Glu Glu Lys Thr Pro Tyr Glu Val Thr His Ser Val Lys Gly Asp
 130 135 140
 Asp Asn Tyr Tyr Ile Ile Phe Thr Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys
 145 150 155 160
 Gly Val Gln Ile Ser His Asp Asn Leu Leu Ser Phe Thr Asn Trp Met
 165 170 175
 Ile Ser Asp Asp Glu Phe Ser Val Pro Glu Arg Pro Gln Met Leu Ala
 180 185 190
 Gln Pro Pro Tyr Ser Phe Asp Leu Ser Val Met Tyr Trp Ala Pro Thr
 195 200 205
 Leu Ala Met Gly Gly Thr Leu Phe Ala Leu Pro Lys Thr Val Val Asn
 210 215 220
 Asp Phe Lys Lys Leu Phe Ala Thr Ile Asn Glu Leu Pro Ile Gln Val
 225 230 235 240
 Trp Thr Ser Thr Pro Ser Phe Ala Asp Met Ala Leu Leu Ser Asn Asp
 245 250 255
 Phe Asn Ser Glu Thr Leu Pro Gln Leu Thr His Phe Tyr Phe Asp Gly
 260 265 270
 Glu Glu Leu Thr Val Lys Thr Ala Gln Lys Leu Arg Gln Arg Phe Pro
 275 280 285
 Lys Ala Arg Ile Val Asn Ala Tyr Gly Pro Thr Glu Ala Thr Val Ala
 290 295 300
 Leu Ser Ala Val Ala Ile Thr Asp Glu Met Leu Glu Thr Cys Lys Arg
 305 310 315 320
 Leu Pro Ile Gly Tyr Thr Lys Asp Asp Ser Pro Thr Tyr Val Ile Asp

ES 2 306 891 T3

	325	330	335													
5	Glu	Glu	Gly	His	Lys	Leu	Pro	Asn	Gly	Glu	Gln	Gly	Glu	Ile	Ile	Ile
				340					345					350		
10	Ala	Gly	Pro	Ala	Val	Ser	Lys	Gly	Tyr	Leu	Asn	Asn	Pro	Glu	Lys	Thr
			355					360					365			
15	Ala	Glu	Ala	Phe	Phe	Gln	Phe	Glu	Gly	Leu	Pro	Ala	Tyr	His	Thr	Gly
		370					375					380				
20	Asp	Leu	Gly	Ser	Met	Thr	Asp	Glu	Gly	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gly	Gly	Arg
	385					390					395					400
25	Met	Asp	Phe	Gln	Ile	Lys	Phe	Asn	Gly	Tyr	Arg	Ile	Glu	Leu	Glu	Asp
				405						410					415	
30	Val	Ser	Gln	Asn	Leu	Asn	Lys	Ser	Gln	Tyr	Val	Lys	Ser	Ala	Val	Ala
			420						425					430		
35	Val	Pro	Arg	Tyr	Asn	Lys	Asp	His	Lys	Val	Gln	Asn	Leu	Leu	Ala	Tyr
			435					440					445			
40	Ile	Val	Leu	Lys	Glu	Gly	Val	Arg	Asp	Asp	Phe	Glu	Arg	Asp	Leu	Asp
		450					455					460				
45	Leu	Thr	Lys	Ala	Ile	Lys	Glu	Asp	Leu	Lys	Asp	Ile	Met	Met	Asp	Tyr
	465					470					475					480
50	Met	Met	Pro	Ser	Lys	Phe	Ile	Tyr	Arg	Glu	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Pro
				485						490					495	
55	Asn	Gly	Lys	Ile	Asp	Ile	Lys	Gly	Leu	Met	Ser	Glu	Val	Asn	Lys	
				500					505					510		

<210> 16

50 <211> 919

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

55

60

65

ES 2 306 891 T3

<400> 16

5	gcccgcactc actgatgccc agcaggcaat cccagggatt aagtttgact gggtaggtgga	60
	agaaggggttc gcacagattc ctccctggca cgctgccgtt gagcgagtta ttccctgtggc	120
	aatacgtcgc tggcgtaaag cctggttctc ggccccata aaagctgaac gcaaagcgtt	180
10	tcgtgaagcg ctacaagcag agaactatga cgcagttatc gacgctcagg ggctggtaaa	240
	aagcgcggca ctggtgacac gtctggcgca tggcgtaaag catggattgg actggcaaac	300
	cgctcgcgaa cctttagcca gcctgttcta caattgtaag catcatattg caaaacagca	360
15	gcacgccgta gaacgcaccc gcgaactgtt tgccaaaagt ttgggctata gcaaaccgca	420
	aaccagggc gattatgcta tcgcacagca ttttctgacg aacctgccta cagatgctgg	480
20	cgaatatgcc gtatttcttc atgcgacgac ccgtgatgat aacactggc cggaagaaca	540
	ctggcgagaa ttgattgggt tactggctga ttcaggaata cggattaaac ttccgtgggg	600
	cgcgccgcat gaggaagaac gggcgaaacg actggcggaa ggatttgctt atggtgaagt	660
25	attgccgaag atgagtctgg aaggcgttgc ccgctgctg gccggggcta aattttagt	720
	gtcggtagat acgggggtaa gccatttaac ggcggcactg gatagacca atatcacggt	780
	ttatggacca accgatccgg gattaattgg tgggtatggg aagaatcaga tggttttag	840
30	ggctccgggg aatgagttgt ctcaattgac agcaaatgct gttaagcggg tcattgaaga	900
	aaacgctgcc atgatttaa	919

35

<210> 17

<211> 1023

<212> DNA

40 <213> *Escherichia coli*

45

50

55

60

65

ES 2 306 891 T3

<400> 17

5	atgcgttttc atggggatat gttattaact actcccgtca ttagttcgct gaaaaaaaaat	60
	taccctgacg caaaaatcga tgtgctgctt tadcaggaca ccatcccgat cctgtctgaa	120
	aatccagaga ttaacgcgct ctacggcata aaaaataaaa aagcaaaagc ctacagaaaa	180
10	attgccaaact tttttcatct catcaaggta ttacgtgccca ataagtatga ccttatcgtc	240
	aatctcaccg atcaatggat ggttgctata ctggttcgct tattaatgc ccggtgtaaa	300
	atctcccagg attatcatca tccgagctct gctttttggc gtaaaagttt caccatattg	360
15	gtgccgttgc aggggtgaaa tgtggtggaa agtaacttat ccgtgctgac cccattggga	420
	ggtgattcgt tgggtgaagca gacaaccatg agttaccgc ctgcaagctg gaaacgtatg	480
	cgctcgcgaac ttgatcacgc tgggtgtgga caaaattatg tggttatcca acctacggcg	540
20	cggcaaatct tcaaatgctg ggacaacgcc aagttttccg ctgtgattga tgccttacat	600
	gctcgtggtt atgaagttgt tctgacgtcc ggcccagata aagacgatct ggctgcgtc	660
25	aatgaaattg cgcagggatg ccagacgcca ccagtaacgg cgctggctgg aaaggtgacc	720
	ttcccggaac ttgggtgcgtt aatcgatcat gcgcagctgt ttattggcgt tgattccgca	780
	ccggcgcata ttgccgctgc agttaatacg ccgctgatat cgctgtttgg tgcgacagac	840
30	catatcttct ggcgctccctg gtcaaataac atgattcaat tctgggcggg agattaccgg	900
	gaaatgccaa cgcgcgatca gcgtgaccga aatgagatgt atctttcggc tattccggcg	960
	gcagatgtca ttgctgctgt cgataaatta ctgccctctt ccacgacagg tacgtcgtta	1020
35	tga	1023

<210> 18

40 <211> 798

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

45

50

55

60

65

ES 2 306 891 T3

<400> 18

```

5      atggttgaac ttaaagagcc gtttgccacg ttatggcgcg gcaaagatcc ttttgaggaa      60
      gttaaaacct tgcagggtga ggtatctcgt gaactggaaa ctgcgcgtac tctgcgcttt      120
      gaaatggcgg gcaaaagcta ttttctcaaa tggcatcgcg gcacgacct gaaagagata      180
10     atcaaaaatt tactctcatt gcggatgcca gtattaggcg ctgaccgca atggaatgcg      240
      attcatcgac tgcgggatgt cggcgttgat actatgtatg gggtggcatt tggcgaaaaa      300
      ggcattgaatc cgctgaccag aacttcattt attattaccg aagatctgac accaaccata      360
15     agtctggaag attactgtgc tgactgggcg actaacctc cagatgttcg cgtaaagcgt      420
      atgcttatta agcgtgtcgc gacgatggcg cgcgatatgc atgctgcggg cattaaccac      480
      cgtgactggt atatctgtca tttcctgctg cacttgctt tttccggtaa ggaagaggag      540
20     ttaaaaattt cggtaattga cctgcaccgg gcgcagcttc gcacgcgcgt tccacgtcgt      600
      tggcgggata aagatcttat tgggctttat tttctctcga tgaatatcgg cctgactcag      660
      cgggatatct ggcggtttat gaaagtgtat tttgccgcc cgcttaaaga cattctcaag      720
25     caggaacaag gactgctgtc gcaagcagaa gcaaaagcca caaaaatcag ggaagaacg      780
      attcgaatat cgttgtaa                                798

```

30 <210> 19

<211> 1125

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

35

<400> 19

```

40     atgatcgttg ctttttgttt atataaatat tttcccttg gcggtttgca gcgcgatttt      60
      atgcgtattg ctccagacagt cgcgcgccga ggtcatcatg ttcgggttta taccagctcg      120
      tgggaaggcg aatgccctga tgatattgaa ctgatcaaag tgccgggtta atcgcatacc      180
      aatcacgggc gcaatgcgga gtattttgcc tgggtgcaaa aacatttacg cgaacatccc      240
45     gtcgataaag tcggtggatt caacaaaatg ccggggctgg acgtttatta tgccgctgat      300
      gtttgttatg ccgagaaagt agcgcaggaa aaaggctttt tctatcgctt gacgtcacgt      360
      tategccatt atgccgctt tgagcgggca accttcgaac agggcaagcc gacacagctg      420
50     ctgatgctga cagataagca aatcgccgat ttccagaaac attatcagac tgaagcggag      480
      cgttttcata ttctgccacc ggggatttat cctgatcgta aatatagcca gcagccagcc      540
55     aatagccgtg aaatcttccg taagaagaat ggaataaccg aacaacaata tttattgttg      600
      caggtcgggt cagacttcac gcgtaaaggt gtcgatcgtt ccattgaagc acttgcttcg      660
      ttaccggatt cgctgcgcca caacacattg ctatatgttg ttgggcagga taaaccgca      720
60     aaatttgagg cactggcaga aaaacgcggc gtgcgcagta atgttcactt cttctcgggg      780
      cgcaacgatg tctcggaaat aatggcggcg gcggatttat tactgcatcc tgccctaccag      840

```

65

ES 2 306 891 T3

```

gaagcggcgg gaattgtgct gctggaagcg attactgcag gattaccggg actaacaact    900
gccgtttgtg gctatgcgca ttatattgtc gacgctaatt gcggcgaggc tattgctgag    960
5  ccattccgcc aggaaacatt gaatgagatt ttacgcaaag cgttaacgca atcttcattg    1020
   cgccaggctt gggcggaaaa tgcgcgacat tatgctgata cacaagattt atacagtctg    1080
   ccagagaaaag cggcggatat cataacgggt ggtctggatg gttga                    1125

```

10

<210> 20

<211> 1047

<212> DNA

15

<213> *Escherichia coli*

<400> 20

20

```

atgaaaatac tggatgatcgg cccgtcttgg gttggcgaca tgatgatgtc gcaaagtctc    60
taccgcacgc tccaggcgcg ctatccccag gcgataatcg atgtgatggc accggcatgg    120
25  tgccgtccat tattatcgcg gatgccggaa gttaacgaag ctattcctat gcctctcggg    180
   cacggagcgc tggaaatcgg cgaacgccgc aaactgggtc atagcctgcg tgaaaagcgc    240
   tacgaccgcg cctacgtctt acccaactcc ttcaaactct cattagtgcc tttcttcgcg    300
30  ggtattcctc atcgcaccgg ctggcgcggc gagatgcgct acggtttact caacgatgta    360
   cgegtgtctg ataaagaagc ctggccgcta atggtggaac gctatatagc gctggcctat    420
   gacaaaaggca ttatgcgcac agcacaagat ctgccgcagc cattgttatg gccgcagttg    480
35  caggtgagcg aaggtgaaaa atcatatacc tgtaatcaat ttctgccttc atcagaacgt    540
   ccgatgattg gttttttgcc gggcgcggag tttggtccgg caaaacgctg gccacactac    600
   cactatgcgg agctggcaaa gcagctgatt gatgaagggt atcaggtggt tctgtttggc    660
40  tcggcgaaag atcatgaagc gggcaatgag attcttgccg ctttgaatac cgagcagcag    720
   gcatggtgtc ggaacctggc gggggaaaca cagcttgatc aagcggttat cctgattgca    780
45  gcctgtaaag ccattgtcac taacgattct ggctgatgc atgttgcggc ggcgctcaat    840
   cgctcgctgg ttgccctgta tggctcagat agcccgact tcacaccgcc gctatcccat    900
   aaagcgcgcg tgatccgttt gattaccggc taccacaaag tgcgtaaagg tgacgctgcg    960
50  gagggttatc accagagctt aatcgacatt actccccagc gcgtactgga agaactcaac    1020
   gcgctattgt tacaagagga agcctga                    1047

```

55

<210> 21

<211> 1017

<212> DNA

60

<213> *Escherichia coli*

65

ES 2 306 891 T3

<400> 21

```

5      atgagtgecc actatnttaa tccacaagag atgatcaata agacaatcat cttcgatgaa      60
      aggccagcgg cgtcagtggc atcatcattc catgttgctt atggcattga taaaaacttt      120
      ctttttggtt gtggtgtttc aatcacgtca gttttgttac ataacaacga cgtgagtttt      180

10     gttttccacg tttttattga tgatatccct gaagccgata tccagcgttt agcccaattg      240
      gcgaaaagct atcgtacctg tatccagatc catctagtaa attgtgaacg gcttaaggca      300
15     ttaccgacga ccaaaaattg gtctattgcc atgtatttcc gttttgtaat tgcagattac      360
      tttattgatc aacaagataa gatcctttac ctggatgctg atatcgctg tcagggaaac      420
      ttaaagccgc tgataacaat ggatcttgcc aataacgttg ctgctgttgt tactgaacgc      480
20     gatgctaact ggtggtcgtt acgggggtcaa agtctgcagt gtaatgaact tgaaaagggt      540
      tactttaatt caggtgtcct gttaattaat aactagcgt gggcgcagga gtcggtttct      600
      gctaaagcga tgtcgatgct tgctgataaa gccatcgttt cccgtttaac ctatatggat      660
25     caagatatcc ttaatcttat cctgttaggg aaagttaa atcattgatgc taaatacaat      720
      acgcaattta gtttaaatta tgaattaaaa aaatcatttg tttgtccaat taatgatgaa      780
      accgtattaa ttcattatgt cggcccgaca aaacctggc attactgggc cggttatcca      840
30     agtgcgcaac cttttatcaa agccaaagaa gcatcgccct ggaaaaatga accgttaatg      900
      cggccagtta actcaaaacta tgctcgttat tgcgccaa gc ataattttaa acaaaaacaaa      960
35     ccaattaacg ggataatgaa ttatatttat ttttttatt taaagataat aaaatga      1017

```

<210> 22

<211> 909

40 <212> DNA

<213> *Escherichia coli*

45

50

55

60

65

ES 2 306 891 T3

<400> 22

5	atggctgcca ttaatacгаа agtcaaaaaa gccgttatcc ccgttgcggg attaggaacc	60
	aggatgttgc cggcgacгаа agccatcccg aaagagatgc tgccacttgt cgataagcca	120
	ttaattcaat acgtcgtгаа tgaatgtatt gcggctggca ttactгааat tgtgctggtt	180
10	acacactcat ctaaaaactc tattгaaaac cactttgata ccagttttга actггаagca	240
	atgctггaaa aacgtгтаа acgtcaactg cttgatгaaг tгcagtctat ttgtccaccg	300
	cacgtгacta ttatгcaagt tгctгagggt ctггcgaaaг gcctгггaca cгcггtatтг	360
15	tgtгctcacc cггtagтггг тгатгaaaccg гtagctггта tttгcctга тгттattctг	420
	гатгаататг aatccгаттт гtcacaggat aacctггcag агатгатccг ccгctttгат	480
	гaaacггггtc atagccagat catгггтгaa ccггттгctг atгггaccгc atatггcггт	540
20	гтггattгca aagгcгттга attagcгccг ггтгaaagcг тaccгатггт тггтгггта	600
	гaaaaaccга aagcггатгт тгcгccгctc aatctгcгта ttггггггcг ttacгtactt	660
25	agcгcгггata tttггcггтт гctггcaaaa acccctccгг гagctгггга тгaaattcag	720
	ctcaccгacг caattгатат гctгатcгаа aaagaaaccг тггаagccta tcatatгaaa	780
	гггаagagcc atгactгcгг таатаaatta ггттacатгc аггccttcгт тгаатacггт	840
30	attcгtcata acaccctггг cacггааттт aaagcctггc ttгаagaaga гатгггcatt	900
	aagaagтаа	909

35 <210> 23

<211> 1641

<212> DNA

40 <213> *Escherichia coli*

45

50

55

60

65

ES 2 306 891 T3

<400> 23

```

5      atggcaatcc acaatcgtgc aggccaacct gcacaacaga gtgatttgat taacgtcgcc      60
      caactgacgg cgcaatatta tgtactgaaa ccagaagcag ggaatgcgga gcacgcgggtg      120
      aaattcggta cttccgggtca cegtggcagt gcagcgcgcc acagctttaa cgagccgcac      180
10     attctggcga tcgctcaggc aattgctgaa gaacgtgcga aaaacggcat cactggccct      240
      tgctatgtgg gtaaagatac tcacgccctg tccgaacctg cattcatttc cgttctggaa      300
      gtgctggcag cgaacggcgt tgatgtcatt gtgcaggaaa acaatggctt caccocgacg      360
15     cctgccgttt ccaatgccat cctggttcac aataaaaaag gtggcccgcct ggcagacgggt      420
      atcgtgatta caccgtccca taaccgcgcg gaagatggtg gaatcaaata caatccgccca      480
      aatggtggcc cggtgatac caacgtcact aaagtgggtg aagacagggc caacgcactg      540
20     ctggccgatg gcctgaaagg cgtgaagcgt atctccctcg acgaagcgat ggcattccggt      600
      catgtgaaag agcaggatct ggtgcagccg ttcgtggaag gtctggccga taticgtgat      660
      atggccgcga ttcagaaagc gggcctgacg ctgggcgttg atccgctggg cggttccggt      720
25     atcgaatact ggaagcgat tggcgagtat tacaacctca acctgactat cgttaacgat      780
      caggtcgatc aaaccttccg ctttatgcac cttgataaag acggcgcgat ccgataggac      840
30     tgctcctccg agtgtgcgat ggcgggcctg ctggcactgc gtgataagtt cgatctggcg      900
      tttgctaacg acccggatta tgaccgtcac ggtatcgtca ctccggcagg tttgatgaat      960
      ccgaaccact acctggcggt ggcaatcaat tacctgttcc agcatcgtcc gcagtgggggc      1020
35     aaagatggtg ccgtcggtaa aacgctgggt tcatctgcga tgatcgaccg tgtgggtcaac      1080
      gacttggggc gtaaactggt agaagtcccg gtaggtttca aatggtttgt cgatgggtctg      1140
      ttcgacggca gcttcggctt tggcggcgaa gagagtgcag gggcttcctt cctgcgttcc      1200
40     gacggcacgc cgtgggtccac cgacaaagac ggcacatca tgtgtctgct ggcggcgaa      1260
      atcaccgctg tcaccggtaa gaaccgcag gaacactaca acgaactggc aaaacgcttt      1320
45     ggtgcgccga gctacaaccg tttgcaggca gctgcgactt ccgcacaaaa agcggcgctg      1380
      tetaagctgt ctccggaaat ggtgagcgc agcaccctgg caggtgacce gatcaccgcg      1440
      cgctgactg ctgctccggg caacgggtgt tctattggcg gtctgaaagt gatgactgac      1500
50     aacggctggt tcgccgcgcg tccgtcaggc acggaagacg catataagat ctactgcgaa      1560
      agcttcctcg gtgaagaaca tcgcaagcag attgagaaag aagcggttga gattggttagc      1620
55     gaagttctga aaaacgcgta a      1641

```

<210> 24

<211> 1677

60 <212> DNA

<213> *Escherichia coli*

65

ES 2 306 891 T3

<400> 24

```

5      atgaaattat ttaaataaat ttactgatt gccgcctgtc acgcggcgca ggccagcgcg      60
      gccattgata ttaacgctga cccaaacctt acaggagccg cgccgcttac cggatttctg      120
      aacgggcaac agtcggatac gcaaaacatg agcggcttcg acaatacccc gccgcctca      180
10     ccgccggtgg taatgagccg tatgtttggg gctcaacttt tcaacggcac cagcgcggat      240
      agcggtgcca cggtaggatt caacctgac tatattctga atccgggtga tagcattcag      300
      gttcgcttgt ggggtgcggt cacctttgat ggtgcgttac aggttgatcc caaaggtaat      360
15     attttctctg cgaacgttgg tccggtgaaa gttgctggcg tcagtaatag tcagctaaat      420
      gccctggtca catccaaagt gaaggaagta taccagtcca acgtcaacgt ctacgcctcc      480
      ttattacagg cgcagccagt aaaagtgtac gtgaccggat ttgtgcgtaa tcctggtctg      540
20     tatggcgggtg tgacgtctga ttcgttactc aattatctga tcaaggctgg cggcgttgat      600
      ccagagcgcg gaagttacgt tgatattgtg gtcaagcgcg gtaaccgcgt gcgctccaac      660
      gtcaacctgt acgacttctt gctgaacggc aaactggggc tttcgcagtt cgcgatgggt      720
25     gacaccatca tcgtcgggcc gcgtcagcat actttcagcg ttcagggcga tgtctttaac      780
      agctacgact ttgagttccg cgaaagcagc attcccgtaa cggaagcgtt gagctggggc      840
30     cgcctaagc ctggcgcgac tcacattacg attatgcgta aacaggggct gcaaaaacgc      900
      agcgaatact atccgatcag ttctgcgcca ggccgatgtg tgcaaaatgg cgatacctta      960
      atcgtgagca ctgaccgcta tgccggcacc attcaggtgc gsgttgaagg cgcacactcc      1020
35     ggtgaacatg ccattggtact gccttatggg tccactatgc gtgcggttct ggaaaaagtc      1080
      cgcgccgaaca gcatgtcgca gatgaacgcg gttcagcttt atcgcccatc agtagctcag      1140
      cgtcagaaag agatgctgaa tctctcgtcg caaaaactgg aggaagcacc actttctgcc      1200
40     cagtcctcca ccaaagaaga agccagcctg cgaatgcagg aagcgcgaact gatcagccgc      1260
      tttgtggcga aagcacgcac cgtagttccg aaagtggaag tgatcctcaa cgaatccaat      1320
      attgattctg ttctgcttga agatggcgac gtcacaaata ttccggagaa aacatcgctg      1380
45     gttatggttc atggcgaagt gctgttcccg aacgcgggtg gctggcagaa ggggatgacc      1440
      accgaggatt acatcgagaa atgtggtggc ctgacgcaga aatcgggtaa cgcagaatt      1500
50     atcgtcattc gtcagaacgg tgctgccgtc aacgcagaag atgtggattc actcaaaccg      1560
      ggcgatgaga ttatggttct gccgaaatat gaatcgaaaa acattgaagt taccctgggt      1620
      atttccacca tcctctatca gctggcgggtg ggtgcaaaag tgattctgtc tttgtaa      1677

```

55

<210> 25

<211> 624

60 <212> DNA

<213> *Escherichia coli*

65

ES 2 306 891 T3

<400> 25

```

5      atgagtaaaa agttaataat atttgggtgcg ggtgggtttt caaaatctat aattgacagc      60
      ttaaatacata aacattacga gttaatagga tttatcgata aatataaaag tggttatcat      120
      caatcatatc caatattagg taatgatatt gcagacatcg agaataagga taattattat      180
10     tattttattg ggataggcaa accatcaact aggaagcact atttaaacad cataagaaaa      240
      cataatctac gcttaattaa cattatagat aaaactgcta ttctatcacc aaatattata      300
      ctgggtgatg gaatTTTTat tggtaaaatg tgtataactta accgtgatac tagaatacat      360
15     gatgccgttg taataaatac taggagttta attgaacatg gtaatgaaat aggctgctgt      420
      agcaatatct ctactaatgt tgtacttaat ggtgatgttt ctggtggaga agaaactttt      480
      gttggtagcg tgactgttgt aaatggccag ttgaagctag gctcaaagag tattattggg      540
20     tctgggtcgg ttgtaattag aaatatacca agtaatgttg tagttgctgg gactccaaca      600
      agattaatta gggggaatga atga                                          624

```

25

<210> 26

<211> 576

<212> DNA

30

<213> *Escherichia coli*

<400> 26

35

40

45

50

```

      gtggcgaaga gcgtaccgc aatTTTTctt gaccgtgatg gcaccattaa tgtcgatcac      60
      ggctatgtcc atgagatcga caactttgaa tttatcgacg gtgttattga cgccatgcgc      120
40     gagctaaaaa aaatgggctt tgcgctgggtg gtagtcacca accagtctgg cattgctcgc      180
      ggtaaatttta ccgaagcaca gtttgaaacg ctgaccgagt ggatggactg gtcgctggcg      240
      gaccgagatg tcgatctgga tggatcttat tattgccgc atcatccgca gggtagtggt      300
45     gaagagtttc gccaggctctg cgattgccgc aaaccacatc cggggatgct tttgtcagca      360
      cgcgattatt tgcataattga tatggccgct tcttatatgg tgggcgataa attagaagat      420
      atgcaggcag cggttgcggc gaacgtggga acaaaagtgc tgggtgcgtac gggtaaacct      480
50     attacacctg aagcagaaaa cgcggcagat tgggtgttaa atagcctggc agacctgccg      540
      caagcgataa aaaagcagca aaaaccggcg caatga                                          576

```

55

<210> 27

<211> 933

<212> DNA

60

<213> *Escherichia coli*

65

ES 2 306 891 T3

<400> 27

5	atgatcatcg ttaccggcgg cgcgggcttt atcggcagca acatcgtaa agccctgaat	60
	gataaaggca tcaccgatat tctgggtggg gacaacctga aagacggcac caagtttgtg	120
	aacctgggtgg atctgaatat cgcagactat atggataagg aagacttcct gatccagatt	180
10	atggctggcg aagagtccgg cgatgtcgaa gcgattttcc acgaaggcgc gtgctcttcc	240
15	accaccgagt gggacggcaa gtatatgatg gataacaact atcaatactc caaggagctg	300
	ctgcactact gcctggagcg tgaaatcccg ttctgtacg cttcttccgc agccacctac	360
	ggcggacgca cctccgactt tattgaatcc cgcgagtacg aaaaaccggt gaacgtctac	420
20	ggttactcaa aattcctggt tgatgaatat gttcgccaaa tcctgccgga agcgaactcg	480
	cagattggtg gcttccgcta tttcaacggt tatggaccgc gtgaaggcca taaaggcagc	540
	atggcgagcg tcgctttcca tctcaacacc cagcttaata acggtgaatc accgaagctg	600
25	ttcgaaggta gcgagaactt taaacgcgac ttcgtctatg ttggcgatgt ggcagatgta	660
	aacctgtggt tcctggaaaa tggcgtttcc ggcatttca acctcggcac cggctcgtgcg	720
	gaatccttcc aggctgtagc tgatgctacg ctggcttacc acaagaaagg ccagatcgaa	780
30	tacattccgt tcccggataa gctgaaaggc cgctaccagg cgttcaactca ggcagatctg	840
	acaaatctgc gcgcgccggg ttacgacaaa ccggtcaaaa ccggtgctga aggtgtaacg	900
35	gaatacatgg cctggctgaa tcgcgacgca taa	933

<210> 28

<211> 1434

40 <212> DNA

<213> *Escherichia coli*

45

50

55

60

65

ES 2 306 891 T3

<400> 28

```

5      atgaaagtaa cgctgccaga gtttgaacgt gcaggagtga tggtaggtgg tgatgtgatg      60
      ctggatcggt actggtaacgg ccccaccagt cgtatctcgc cggaaagcgcc ggtgcccgtg      120
      gttaaagtga ataccatcga agaacgtccg ggcggcgcgg ctaacgtggc gatgaatata      180
10     gcttctctcg gtgctaatac acgcctggtc gggttgacgg gcattgacga tgcagcgcgc      240
      gcgctgagta aatctctggc cgacgtcaac gtcaaatgcg acttcgtttc tgtaccgacg      300
      catccgacca ttaccaaatt acgggtactt tcccgaacc aacagctgat ccgtctggat      360
15     tttgaagaag gtttcgaagg tgttgatccg cagccgctgc acgagcggat taatcaggcg      420
      ctgagttcga ttggcgcgct ggtgctttct gactacgcc aaggtgcgct ggcaagcgta      480
      cagcagatga tccaactggc gcgtaaagcg ggtgttccgg tgctgattga tccaaaagg      540
20     accgattttg agcgtaccg cggcgtacg ctgttaacgc cgaatctctc ggaatttgaa      600
      gctgttgcg gtaaagttaa gaccgaaga gagattgtt agcgcggcat gaaactgatt      660
      gccgattacg aactctcggc tctgttagtg acccgttccg aacagggtat gtcgctgctg      720
25     caaccgggta aagcgcgct gcatatgcca acccaagcgc aggaagtgta tgacggtacc      780
      ggtgccccgc acacggtgat tggcgtcctg gcggcaacgc tggcagcggg taattcgctg      840
      gaagaagcct gcttctttgc caatgcggcg gctggcgtgg tggtcggcaa actgggaacc      900
30     tccacggttt cgccgatcga gctggaaaat gctgtacgtg gacgtgcaga tacaggcttt      960
      ggcgtgatga ccgaagagga actgaagctg gccgtagcgg cagcgcgtaa acgtggtgaa      1020
35     aaagtggtag tgaccaacgg tgtctttgac atcctgcacg ccgggcacgt ctcttatctg      1080
      gcaaatgccc gcaagctggg tgaccgcttg attggtgccc tcaacagcga tgcctccacc      1140
40     aaacggctga aaggggatc ccgcccggta aaccactcg aacagcgtat gattgtgctg      1200
      ggcgcactgg aagcggtcga ctgggtagtg tggtttgaag aggacacgcc gcagcgttg      1260
      atcgccggga tcttgccaga tctgctggtg aaaggcggcg actataaacc agaagagatt      1320
45     gccgggagta aagaagtctg ggccaacggg ggcgaagtgt tggtagctca ctttgaagac      1380
      ggtgctcga cgaccaacat catcaagaag atccaacagg ataaaaaagg ctaa      1434

```

<210> 29

50 <211> 1263

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

55

60

65

ES 2 306 891 T3

<400> 29

5	atgcttaaac	gtctaggtaa	agtatttggga	cctctagttt	gtgctttact	attgttggta	60
	ggattatatac	ttgtttttcc	tgtttctcag	cctcatcatt	taggtaagga	aaaaaacagt	120
	gcagtagcgt	tgacaaaggc	aggttttaa	agcagagttc	aaaaagttag	agctttcagt	180
10	gatcctaag	ccaattttgt	ccctttcttt	ggttcaagtg	agtgggtaag	at ttgatgca	240
	atgcatccat	cagtttttagc	agaggcttac	aaaaggcctt	atatcccata	tcttttaggt	300
	caaaaagggg	cggtctctct	gacacaatac	tatggcattc	aacagattaa	aggacaaatc	360
15	aaaaataaaa	aagctatcta	tgttatttct	ccgcaatggt	ttgttcgcaa	gggagccaac	420
	aaagggtgctt	ttcaaaacta	tttcagcaac	gatcaaacca	ttcgattttt	gcaaaatcaa	480
	acagggacaa	cctacgatag	gtatgctgct	cgctcgattgt	taaaattata	tcctgaagct	540
20	tctatgtcag	at ttgataga	aaaagttgca	gatggccaaa	aactatcaaa	taaagacaaa	600
	caaagactaa	agtttaatga	ttgggtat tt	gagaagacag	atgctat tt	tagctatcta	660
	ccactaggaa	aaacttataa	tcaggtaata	atgcctcatg	ttggtaaatt	accgaaagca	720
25	ttctcatata	atcattttatc	gcgtattgca	tcacaagatg	ctaaagtagc	aacgagatca	780
	aatcaatttg	gtattgatga	tcgcttttac	caaacaagaa	ttaaaaagca	cttaaaaaaa	840
	ttgaaaggg	cacaacgaca	tttcaattat	actaagtcac	cagaatttaa	tgattttacag	900
30	ttggttctta	atgaattctc	aaaacaaaat	acagatgtcc	tttttgtcat	accaccagta	960
	aataaaaagt	ggacagacta	cacagggctt	gatcaaaaa	tgtatcaaaa	atctgtagaa	1020
35	aaaataaaac	accaacttca	aagtcaaggt	ttcaatcata	tctctgacct	ttctcgagat	1080
	ggaggtaagc	catactttat	gcaagataca	atccatttag	g ttggaatgg	ttggtttagag	1140
	ctagataagc	atatcaatcc	at ttttaaca	gaggaaaaca	gcaagccaaa	ttatcacatt	1200
40	aataataaat	ttttgaagag	atcttgggca	aaatatacag	gacgtccaag	tgattacaag	1260
	taa						1263

45 <210> 30

<211> 1536

<212> DNA

<213> *Escherichia coli*

50

55

60

65

ES 2 306 891 T3

<400> 30

```

    atgatacatg atatgattaa aacaattgag cattttgctg agacacaagc tgattttcca      60
    gtgtatgata ttttagggga agtccatact tatggacaac ttaaagtaga ctctgactct      120
5    cttagctgctc atattgatag cctaggcctt gttgaaaaat cacctgtctt agtattcggg      180
    ggtcaagaat atgaaatggt ggcgacattt gttgctttaa caaagtcagg gcatgcttat      240
    ataccggttg accaacactc tgctttggat agaatacagg ctattatgac agttgctcaa      300
10   ccaagcctta tcatttcaat tgggtaattt cctcttgaag ttgataatgt cccaatccta      360
    gacgtttctc aagtttcagc tttttttgaa gaaaagactc cttatgaggt aacacattct      420
    gttaaagggtg atgataatta ctatattatt ttcacttcag ggactactgg tttaccaaaa      480
15   ggtgtgcaaa tttcacatga caatttattg agctttacaa attggatgat ttctgatgat      540
    gagttttcag ttcctgaaag accgcaaatg ttgggtcaac cgccatattc atttgactta      600
    tcagttatgt attgggcacc aacactagct atggggaggca cctgttttgc cctaccaaaa      660
20   acagtagtta atgatttcaa aaaactattc gctaccatta atgaattgcc aatacagggt      720
    tggacttcca caccatcatt tgctgatatg gcgctactat ctaacgattt caattcagag      780
    accttgccac agttaacaca tttttatfff gatggggaag agttaactgt caagactgca      840
25   caaaaacttc gtcaacggtt tccaaaagct cgtatcgtta atgcatatgg gccaacagaa      900
    gcaacagttg ctctatccgc agtagcaatt actgatgaaa ttttagaaac atgcaaacgc      960
    cttccaattg gttacactaa agatgactca ccaacgtatg tgattgatga agaaggctcat      1020
30   aaattaccaa acggagagca aggtgaaatc attattgctg gaccagcagt atcaaaaggc      1080
    tatcttaaca atccagaaaa gacagctgag gcatttttcc aattcgaagg tctacctgct      1140
    taccataccg gtgacttagg aagtatgacc gatgaaggtc ttctgcttta cggtgggctc      1200
35   atggatttcc aaattaaatt taacggctat cgtattgaat tagaagatgt ttctcaaaac      1260
    ttaaacaaat cgcagtatgt aaaatcagca gtagcagtgc cacgttataa caaggatcat      1320
    aaagttcaaa acttatttagc ctatattgtc ttaaaagaag gtgtaagaga tgattttgaa      1380
40   cgtgatttgg atttgacaaa agcaattaag gaagacttaa aggacattat gatggattac      1440
    atgatgcat ctaaatttat ctatcgagag gatttacctt tgacaccaa tgggaaaatt      1500
    gatatcaaag gtcttatgag cgaggtaaac aagtga                                  1536

```

45 <210> 31

<211> 60

<212> DNA

50 <213> *Escherichia coli*

<400> 31

55 tcgtgcagcc caacctgcac aacagagtga ttgattaac gtgtaggctg gagctgcttc

60

<210> 32

<211> 60

60 <212> DNA

<213> *Escherichia coli*

<400> 32

65 cagggtgctg gcgctacca ttccggaga cagcttagac acatatgaat atcctcctta

60