

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 280**

51 Int. Cl.:
C07K 14/285 (2006.01)
A61K 39/102 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05017940 .7**
96 Fecha de presentación: **18.08.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1657248**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.05.2006**

54 Título: **VACUNA PARA PREVENIR Y TRATAR LA RINITIS ATRÓFICA PROGRESIVA PORCINA.**

30 Prioridad:
20.08.2004 CN 200410057590

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2012

73 Titular/es:
**NATIONAL CHUNG-HSING UNIVERSITY
NO. 250, KUO KUANG ROAD
SOUTH DISTRICT 402 TAICHUNG CI, TW**

72 Inventor/es:
**Chien, Maw-Sheng;
Liu, Cheng-I y
Liao, Chih-Ming**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 375 280 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna para prevenir y tratar la rinitis atrófica progresiva porcina

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. CAMPO DE LA INVENCION

10 [0001] La presente invención está, en general, en el campo de las vacunas veterinarias, composiciones de vacuna y procedimientos de producir las mismas. Particularmente, en el presente documento se proporcionan las vacunas para inmunizar animales contra la rinitis atrófica progresiva (RAP), que comprende una combinación de tres fragmentos de toxinas de subunidades recombinantes de *Pasteurella multocida* (rsPMT), cada uno con una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos de aminoácidos 2-486, 486-986 o 986-1281 de la toxina de *Pasteurella multocida* (PMT).

15

2. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

20 [0002] La rinitis atrófica progresiva (RAP) es una importante enfermedad de las vías respiratorias altas en cerdos. Las lesiones características incluyen hipoplasia ósea turbinaza, distorsión facial y hemorragia nasal como consecuencia de los frecuentes estornudos. Además, la RAP produce una significativa pérdida económica global en la producción de cerdos debido al retraso del crecimiento. En varios estudios se ha demostrado que la toxina de *Pasteurella multocida* (PMT) es el principal factor de virulencia responsable de la atrofia turbinaza que se ve en la RAP (véase, por ejemplo, Ackermann MR y col. 1996; Am J Vet Res 57(6):848-852; y Lax AJ & Chanter N. 1990; J Gen Microbiol 136:81-87). La inoculación de PMT sola podría reproducir todos los síntomas principales de la RAP en cerdos expuestos de forma experimental. La PMT, en aerosol o inyectada en los cerdos, produce una atrofia turbinaza grave y reduce la ganancia de peso (Kamp EM & Kimman TG 1988; Am. J. Vet. Res. 49:1844-1849). Los mecanismos por los cuales la PMT reduce la ganancia de peso y la atrofia ósea conchal se han estudiado extensamente. Los resultados de varios estudios indican que la PMT podría incrementar la resorción ósea y reducir la formación de hueso alterando las funciones de los osteoblastos y los osteoclastos.

30

35 [0003] La base molecular de la virulencia de la PMT sigue sin estar clara, pero puede estar asociada con la activación de los osteoclastos o inactivación de los osteoblastos. Se ha demostrado que la PMT es un potente mitógeno para varios tipos de células, como los fibroblastos 3T3 de cerdo. La PMT podía inducir una estimulación semimáxima de la síntesis de ADN y la proliferación celular a dosis tan bajas como 1 pM. El efecto de la PMT sobre los osteoclastos y osteoblastos porcinos se ha investigado usando un sistema de cultivo celular in vitro. La exposición de las células de médula ósea a la vitamina F3 y a PMT durante el crecimiento condujo a un incremento del número de células y la aparición temprana de los osteoclastos en comparación con los controles. Las concentraciones bajas de PMT dieron como resultado retraso del crecimiento u disminución de la formación de nódulos en los osteoblastos, mientras que las concentraciones altas de PMT aumentaron la muerte celular e inhibieron la formación de módulos (Gwaltney SM y col. 1997; Vet Pathol 34(5):421-430). PMT también estimula la proliferación celular, pero afecta a la maduración celular y a la función celular en cultivos primarios de osteoblastos de rata. Estos hallazgos sugieren que PMT pueden incrementar la resorción ósea y disminuir la aposición ósea, lo que, en última instancia, conduce a osteólisis progresiva y a atrofia ósea continua.

40

45 [0004] Muchos posibles patógenos bacterianos pueden colonizar la cavidad nasal o las amígdalas de cerdos y *P. multocida* es uno de los principales patógenos oportunistas capaces de producir el complejo de enfermedad respiratoria porcina (CERP). De hecho, la RAP se considera una enfermedad respiratoria contagiosa con una elevada prevalencia en las áreas del mundo en la que se practica la cría moderna de cerdos. Los antibióticos, la vacunación y la buena gestión pueden reducir la gravedad y la frecuencia de la RAP. No obstante, el uso excesivo de antibióticos es una fuente de problemas para la salud pública y la vacunación ha surgido como el abordaje más atractivo en el control de la RAP (Foged NT y col. Vet Rec 1989; 125(1):7-11; Kobisch M, Pennings A, Vet Rec 1989; 124 (3):57-61; y Sakano T y col. J Vet Med Sci 1997; 59(1):55-57).

50

55 [0005] La totalidad del gen de PMT (toxA) que codifica una proteína de 1285 aminoácidos se ha clonado y expresado en *E. coli* (Petersen SK & Foged NT 1989; Infect Immun 57(12):3907-3913). Se ha demostrado que un derivado de PMT recombinante que carece de los residuos de aminoácidos 27-147 en N-terminal induce una respuesta protectora contra la exposición a una dosis letal de PMT en ratones (Petersen SK y col. 1991; Infect Immun 59(4):1387-1393), y que reduce la colonización por *P. multocida* toxigénica en las narinas y amígdalas de los cerdos (Nielsen JP y col. 1991; Can J Vet Res 55(2):128-138). Por tanto, los derivados de PMT recombinantes pueden servir como inmunógenos ideales para producir una buena respuesta protectora sin causar citotoxicidad en animales.

60

65 [0006] La formalina es el reactivo más frecuente usado para inactivar la PMT, pero puede inducir alteraciones químicas que pueden reducir la inmunogenicidad o la eficacia de las vacunas (Nielsen JP y col. 1991; como se ha descrito). Por tanto, un derivado de PMT no tóxico pero inmunogénico podría ser ventajoso para el desarrollo de

vacunas eficaces contra la RAP. La mayoría de las vacunas contra la RAP probadas hasta la fecha consisten en cultivos inactivados de *P. multocida* o de toxoides de PMT. Los toxoides se preparan mediante el tratamiento de PMT con formaldehído, que elimina la toxicidad manteniendo la antigenicidad. Estas vacunas para la RAP son eficaces cuando se prueban en granjas. No obstante, PMT constituye menos del 0,6 % de las proteínas celulares de *P. multocida*, lo que hace necesario cultivar una gran cantidad de bacterias con el fin de obtener suficiente antígeno para usar a escala comercial. Las vacunas con toxoide tradicionales requieren el cultivo a gran escala de una cepa toxigénica de *P. multocida* y un procedimiento tedioso y caro para la preparación del toxoide de PMT. Además de requerir tiempo y ser caro, la necesidad de usar reactivos inactivantes, tales como formaldehído, puede inducir alteraciones químicas incontrolables en la inmunogenicidad de proteínas que pueden reducir o eliminar la eficacia de dichas vacunas.

[0007] La porción en N-terminal de PMT (residuos 1 a 506 a.a.) se ha considerado que contiene el supuesto dominio de unión a la célula y el dominio de translocación. La inmunización de rsPMT Tox1 en N-terminal (Residuos 1 a 487 aa) podría producir anticuerpos neutralizantes que podrían impedir la unión de PMT a las células diana y, posteriormente, su translocación a través de la membrana celular. En consecuencia, se bloqueó la actividad de PMT. Además, se ha sugerido que la porción en C-terminal de PMT era el dominio catalítico y los anticuerpos producidos contra los fragmentos en C-terminal (residuos 681-1285 y 849-1285) eran capaces de inhibir el efecto mitogénico de PMT. Se demostró que los residuos 1165 (cisteína), 1205 (histidina) y 1223 (histidina) eran esenciales para la actividad intracelular de PMT (Baldwin MR y col. 2004; 54(1):239-250; y Pullinger GD y col. 2001; Infect. Immun. 69: 7839-7850). Los derivados de rsPMT son fáciles de producir y no son citotóxicos, de modo que no se requiere una inactivación química adicional antes de usar. La patente de EE.UU. n° 6.110.470 divulgó los derivados polipeptídicos de la toxina de *P. multocida*, que comprende las secuencias de aminoácidos idénticas a PMT pero carece de los aminoácidos 1043-1130 o carece de los aminoácidos 1130-1285.

[0008] Así, en la presente invención se producen tres derivados de la subunidad recombinante de PMT (rsPMT), que representan las porciones en N-terminal (aa. 2-486), del centro (aa. 486-986) y C-terminal (aa. 986-1281) de PMT, y sus inmunogenicidades se caracterizan evaluando el nivel de células secretoras de anticuerpos específicos de PMT, los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero y el grado de proliferación linfocitaria en ratones y cerdos inmunizados. La eficacia de estas subunidades recombinantes como vacuna se evaluó en cerdas preñadas y su descendencia mediante el análisis de los títulos de anticuerpos neutralizantes en el calostro y el suero, y mediante monitorización de la tasa de supervivencia y la ganancia de peso medio en lechones tras la exposición a PMT.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] Un aspecto de la presente invención es proporcionar una vacunas para inmunizar animales contra la rinitis atrófica progresiva (RAP), que comprende una combinación de tres proteínas, comprendiendo cada uno de ellas un fragmento de toxinas de subunidades recombinantes de *Pasteurella multocida* (rsPMT), en el que el fragmento consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 2-486, 486-986 o 986-1281 en la SEC ID N° 2, respectivamente.

[0010] En una realización, los fragmentos de PMT se fabrican en la célula huésped que se ha transformado con un plásmido que comprende la secuencia codificadora de un fragmento de la toxina de *P. multocida* 2-486, 486-986 y/o 986-1281. La célula huésped usada en el presente documento puede ser procarionta o eucariota.

[0011] En el segundo aspecto, la presente invención proporciona una vacuna multivalente contra la rinitis atrófica progresiva (RAP), que comprende una combinación de tres proteínas como se ha descrito anteriormente como primer componente y al menos un antígeno o epítipo asociado con otra patología animal. En una realización, la vacuna multivalente se usa para prevenir y/o tratar la rinitis atrófica progresiva (RAP) y la seudorabia (PR).

BREVE DESCRIPCION DE LA FIGURAS

[0012]

La Figura 1 representa las proteínas celulares totales expresadas por diferentes clones de rsPMT *E. coli* separadas en 10% de SDS-PAGE (A), seguido de análisis de transferencia Western usando el anticuerpo monoclonal anti-PMT (B) o suero inmunológico de cerdo (C). Calle 1, patrones de proteínas (BIO-RAD); calle 2, Tox1 (86 kDa); calle 3, Tox2 (86 kDa); calle 4, Tox7 (55.4 kDa); calle 5, Tox6 (158 kDa); calle 6, PMT (155 kDa); calle 7, pET 32b(+). La localización de cada proteína rsPMT expresada se indica con una flecha y la PMT nativa sintetizada en *P. multocida* PMD 48 se indica con la punta de flecha.

La Figura 2 representa la citotoxicidad de rsPMT y PMT nativa sobre las células Vero. Las monocapas de las células Vero se trataron con DMEM (A), 140 ng/ml de PMT nativa (B) y 1,5 mg/ml de Tox1 (C), respectivamente a 37 °C durante 7 días. La morfología celular se visualiza mediante microscopio de contraste de fases (Olympus IX-70). Aumento 100X.

La Figura 3 representa las ASN específicas de PMT de ratones inmunizados presentes en el bazo 14 días después de la vacunación de refuerzo (barras abiertas) y la dosis letal de PMT nativa a la que ha sido expuestos

(barras cerradas). En cada punto de tiempo se estudiaron 3 ratones/grupo. #Significativamente ($p < 0,05$) diferente con ratones inmunizados con toxoide tras la vacunación de refuerzo.*Significativamente ($p < 0,05$) diferente con ratones inmunizados con toxoide tras exposición a PMT nativa.

5 La Figura 4 representa ASC específicas de PMT detectadas en ganglios linfáticos pulmonares (A) y de bazo (B) de lechones tras inmunización de refuerzo (vacunados) y la posterior exposición a PMT (expuestos) o a un refuerzo con un antígeno homólogo (reforzados). Los resultados de cada experimento se analizaron para determinar el efecto del tratamiento usando una distribución t de Student. Los resultados estadísticos se consideraron significativos cuando los valores de p fueron inferiores o iguales a 0,05 (*).

10 La Figura 5 representa ASC específicas de PMT detectadas en ganglios linfáticos pulmonares (A) y de bazo (B) de lechones tras inmunización de refuerzo (vacunados) y la posterior exposición a PMT (expuestos) o a un refuerzo con un antígeno homólogo (reforzados). El título de SN se expresó como la dilución de punto final de suero que podía inhibir la citotoxicidad de cuatro veces la DMT de la PMT auténtica en células Vero.

15 La Figura 6 representa las fotografías representativas de las conchas turbinazas de cerdos experimentales en grupos vacunados con vacuna de rPMT (B), vacuna del toxoide de la RA convencional (C) y no vacunados (D) a las 2 semanas de la exposición a la auténtica PMT.

Los cerdos no vacunados y no expuestos sirvieron como control negativo (A).

La Figura 7 representa los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero específicos de PMT en cerdas preñadas y tras la inmunización de refuerzo (vacunados) de la vacuna bivalente de RAP-RP.

20 La Figura 8 representa los títulos de anticuerpos neutralizantes en suero específicos de RP en cerdas preñadas y tras la inmunización de refuerzo de la vacuna bivalente de RAP-RP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

25 **[0013]** A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la técnica de la invención entiende habitualmente.

30 **[0014]** La vacuna de acuerdo con la presente invención comprende una combinación de tres fragmentos de toxinas de subunidades recombinantes de Pasteurella multocida (rPMT), cada uno con una secuencia de aminoácidos que corresponde a los residuos de aminoácidos 2-486, 486-986 o 986-1281 en la SEC ID N° 2. Los fragmentos de rPMT se puede expresar en células procariotas o eucariotas transformadas con un plásmido que comprende la secuencia de codificación de los fragmentos de la toxina de Pasteurella multocida.

35 **[0015]** Como se usa en el presente documento, una combinación se refiere a cualquier asociación entre dos o más elementos.

[0016] Como se usa en el presente documento, la producción mediante la técnica de ADN recombinante usando procedimientos de ADN recombinante significa el uso de procedimientos bien conocidos de biología molecular para expresar proteínas codificadas por el ADN clonado.

40 **[0017]** Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. En general, los vectores de expresión están en forma de "plásmido", que, en general, son bucles de ADN bicatenario circular que no están unidos al cromosoma.

45 **[0018]** Como se usa en el presente documento, "residuo de aminoácido" se refiere a un aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos.

50 **[0019]** La secuencia de aminoácidos que "corresponde sustancialmente a" significa con homología de secuencia de aproximadamente más o igual a 80%, 85%, 90%, 95% o 99%; el porcentaje preciso se puede especificar si es necesario.

55 **[0020]** Ejemplos de adyuvante convencional usado en las presentes formulaciones de vacunas incluyen compuestos de aluminio, también conocidos como gel de aluminio, tal como hidróxido de aluminio, $Al(OH)_3$ y fosfato de aluminio, $AlPO_4$; sulfato de aluminio potasio, $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (D.E.S. Stewart-Tull (1996), Aluminum adjuvants. en Vaccine protocols, Robinson, A., G. H., y C. N. Wiblin, Farrar Human Press. Totoga, New Jersey, USA. pp. 135-139); adyuvante completo de Freund, FCA; adyuvante incompleto de Freund, FIA; emulsión de agua en aceite, A/A; emulsión de aceite en agua, A/A y similares.

60 **[0021]** La concanavalina A, Con A, es un inmunoestimulante eficaz con células T de activación. Las respuestas proliferativas de los linfocitos T secretan IL-2 y otras citoquinas para estimular las respuestas inmunitarias asociadas.

Ejemplos

5 [0022] Otras características de la invención serán evidentes en el curso de las descripciones siguientes de las realizaciones de ejemplo. Estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración de la invención y no se pretende que la invención se limite a ellos.

Ejemplo 1. Construcción de clones derivados de PMT.

10 [0023] *Pasteurella multocida* PMD 48 es un aislamiento toxigénico de tipo D obtenido de un cerdo afectado por un caso típico de RAP en Taiwan (Liao CM y col. 2002; Taiwan Vet J 28(4):281-293.). *P. multocida* PMD 48 se cultivó en caldo de infusión de cerebro corazón (BHI) (Difco) para la preparación de la toxina de *Pasteurella multocida* auténtica y la extracción de ADN genómico. La cepa BL21 de *E. coli* (DE3) (Novagen) se cultivó en medio de Luria-Bertain (LB) para la clonación y expresión de proteínas. Las secuencias de codificación de la proteína PMT se clonaron en los vectores de expresión pET basados en el promotor T7 (Novagen). Las enzimas de restricción y la T4 ADN ligasa se obtuvieron del New England Biolabs.

20 [0024] Se creó un producto génico de PMT de longitud completa mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos de PMT (directo: 5'AGAGGTTATGGATCCGAAAACAAAACATTTT3'; inverso: 5'CTCTTGTTAAGCTA GCCTTTGTGAAAAGAGGAG3'). El producto génico de PMT de longitud completa se purificó y después se digirió con las combinaciones adecuadas de las enzimas de restricción para producir tres regiones de codificación diferentes del gen de PMT. El fragmento de 1459 pb de BamHI/HindIII que codifica los aminoácidos 1-487 en N-terminal de PMT se clonó en pET32b para generar el clon Tox 1.

25 [0025] El fragmento de 1508 pb de HindIII/HindIII que codifica la región central (aa 485 a 987) de PMT se clonó en pET32b para generar el clon Tox 2. El fragmento de 891 pb de HindIII/NheI que codifica la región en C-terminal (aa 986 a 1282) de PMT se clonó en pET25b y después se subclonó el fragmento BamHI/BlnI en pET32b para generar el clon Tox 7 en C-terminal.

30 [0026] Los plásmidos de expresión recombinante Tox1, Tox2, y Tox7 se transformaron en BL21 de *E. coli* (DE3) de acuerdo con el manual del fabricante. La expresión de rsPMT se indujo con

35 [0027] isopropil-β-D-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG; Protech), y la rsPMT se purificó usando los kit His Bind® (Novagen, Darmstadt, Alemania) de acuerdo con el manual del fabricante. La concentración de proteínas se cuantificó usando el reactivo de ensayo de proteínas Bio-Rad (BIO-RAD, Hercules

[0028] CA). Se preparó PMT auténtica a partir de *P. multocida* PMD 48 cultivada en medio NHI a 37 °C durante 26 horas como se ha descrito anteriormente Nakai T y col. 1984; Infect Immun 46(2):429-434). La PMT auténtica se destoxificó con 0,2 % (v/v) de formalina (Fisher) a 37 °C con agitación durante 48 h para generar el toxoide de PMT.

40 Ejemplo 2 Expresión y purificación de rsPMT

45 [0029] Las rsPMT se expresaron como proteínas de fusión que contienen un péptido de fusión en N-terminal. Los plásmidos Tox1, Tox2, Tox6 y Tox7 se transformaron en BL21 de *E. coli* competente (DE3) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una única colona de cada transformante se cultivó a 37 °C en medio Luria-Bertain (LB) que contiene 100 µg/ml de ampicilina hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 1,0. Después se añadió isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de Mm. El cultivo se incubó durante 6 horas adicionales a 37 °C. Las células se recogieron mediante centrifugación y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 0,1% de Triton X-100. Las células se rompieron mediante sonicación y la suspensión se mezcló con un volumen igual de 2x SDS-PAGE tampón de muestra (Tris-HCl 125 mM [pH6,8], 20% de glicerol, 4% de SDS, 10% de β-mercaptoetanol, 0,25% de azul bromofenol) y las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE. Se preparó PMT nativa a partir de *P. multocida* PMD 48 cultivada en medio BHI a 37 °C durante 26 horas como se ha descrito anteriormente (21). Después de romper las células, las fracciones insolubles que contienen rsPMT se recogieron mediante centrifugación. Las fracciones insolubles se disolvieron en tampón de solubilización (CAPS 50 mM, 0,3% de N-lauroilsarcosina, 1 mM DTT; Novagen, Darmstadt, Alemania) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras la centrifugación, el sobrenadante que contiene la proteína solubilizada se transfirió a un tubo limpio para una purificación adicional de proteína. La rsPMT se purificó usando el kit His Bind® (Novagen, Darmstadt, Alemania) de acuerdo con el manual del fabricante, seguido por replegamiento en 10 volúmenes de PBS a 4°C durante la noche. Después de concentrar con Amicon® Ultra 30,000 MWCO (Millipore, Bedford, EE.UU.), La concentración de proteínas se cuantificó usando el reactivo de ensayo de proteínas Bio-Rad (BIO-RAD, Hercules, CA).

60 [0030] Tres proteínas de subunidades recombinantes de PMT que representan las regiones en N-terminal (Tox1; aa 1 a 487), central (Tox2; aa 485 a 987) y C-terminal (Tox7; aa 986 a 1282) de PMT, respectivamente, se produjeron con éxito en *E. coli*. El peso molecular de Tox1, Tox2 y Tox7 sobre 10% de SDS-PAGE fue 86, 86 y 55,4 kDa, respectivamente (Fig. 2). Las eficiencias de expresión de las proteínas rsPMT variaron de 28-35% de la proteína celular total (datos no mostrados). La expresión de rsPMT aumentó considerablemente hasta 60 veces en las

proteínas celulares totales. Estos resultados sugieren que, en comparación con la producción de PMT nativa, se podían obtener cantidades suficientes de proteínas rsPMT para disminuir suficientemente los costes de la preparación de la vacuna.

5 Ejemplo 3. Ensayo de citotoxicidad de rsPMT en ratones

[0031] Se obtuvieron células de riñón de mono verde africano (Vero, ATCC CCL-81) en Food Industry Research and Development of Taiwan, R.O.C. y se cultivaron en medio DMEM suplementado con L-glutamina 2 mM, 1,5 g/l de bicarbonato sódico, piruvato sódico 0,1 mM y 5% de suero bovino fetal (FCS, Gibco/BRL). Las células Vero se sembraron en los pocillos de placas de 96 pocillos (Costar) a una densidad de 5×10^4 células por pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante la noche. A las monocapas de células se añadieron diluciones en serie de las proteínas de rsPMT o de PMT nativa y las células se incubaron en DMEM que contienen 2 % de FCS a 37 °C durante 5-7 días. Los efectos citopáticos consistentes en formación de nódulos en la monocapa se visualizaron mediante microscopio de contraste de fase (Olympus IX-70) y se calculó la dosis mínima tóxica (DMT) para cada rsPMT y la PMT nativa. Todas las rsPMT eran no citotóxicas (Fig. 3), incluso a dosis tan elevadas como 1,5 mg/ml. En contraste con ello, la dosis mínima tóxica (DMT) de la PMT nativa fue de 140 ng/ml, que será al menos 10.000 más tóxica para las células Vero que cualquiera de las demás proteínas rsPMT.

[0032] *DL₅₀ en ratones.* Cincuenta ratones SPF BALB/c se repartieron en grupos al azar y se inoculó a cada ratón por vía intraperitoneal (i.p.) 0,5 ml de una suspensión que contenía una concentración seleccionada de rsPMT o de PMT nativa a las seis semanas de edad. Se observó a estos ratones durante 14 días tras la inoculación y se registró la mortalidad. La *DL₅₀* se determinó mediante el procedimiento del punto final al 50 % de Behrens-Karber (13). Los ratones a los que se inoculó la PMT nativa mostraron una capa de pelo áspero, anorexia y reticencia a moverse. Estos animales se acurrucaron en las esquinas de las jaulas y murieron en 2-3 días. En la necropsia, las lesiones incluyeron congestión o hiperemia de los órganos y atrofia del bazo. La *DL₅₀* de la PMT nativa en ratones BALB/c fue 1,30 µg. En contraste con ello, no se observaron síntomas clínicos significativos, lesiones macroscópicas u otros hallazgos patológicos en ratones que recibieron dosis tan altas como de 1 mg de proteínas rsPMT (Tabla 1).

Tabla 1. Eficiencia de la expresión de PMT nativa y subunidad recombinante, y su dosis letal del 50 % (*DL₅₀*) en ratones BALB/c

Proteína recombinante/prot eína celular total (%) ^a	PMT subunidad recombinante				PMT nativa
	Tox1	Tox2	Tox6	Tox7	
<i>DL₅₀</i> (µg/0,5 ml) ^b	>1000	>1000	ND	>1000	1,30

^aLa eficacia de la expresión se analizó con un sistema de imagen Alphalmager™ 2200.
^bLa *DL₅₀* se presentó como la concentración de proteína necesaria para matar el 50% de los ratones.

5 Ejemplo 4. Propiedades inmunoprotectoras de las proteínas rsPMT en ratones ELISPOT de células secretoras de anticuerpos

[0033] Una suspensión de MNC de bazo de ratón se analizó para determinar ASC específicas de MT mediante el ensayo de inmunomancha unido a enzimas (ELISPOT). Placas de 96 pocillos con fondo de nitrocelulosa (Millititer HA, Millipore Corp) se revistieron con rsPMT (100 ng/ml) y se incubaron a 4 °C durante la noche. La placa se lavó con PBS que contenía 0,05 % Tween-20 (PBS-T) y se bloqueó con PBS que contenía 0,5 % de seroalbúmina bovina. Tras la incubación a 37 °C. durante 1 hora, la placa se lavó una vez con PBS-T y se incubó con diluciones en serie de una suspensión de MNC. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera que contenía CO₂ al 5 % durante otras 6 horas más. La placa se lavó una vez con PBS-T, seguido por la reacción con IgG anti-ratón de cabra conjugada con fosfatasa alcalina diluida en PBS a 37 °C durante 1 hora. Por último, la placa se lavó seis veces con PBS-T y se hizo reaccionar con una solución de cromógeno/sustrato NBT/BCIP (Sigma) a temperatura ambiente durante de 15 a 20 minutos. Después de aclarar con agua desionizada, las manchas de color presentes en cada pocillo se visualizaron y cuantificaron con estereomicroscopio.

[0034] Los bazos de ratón aumentaron considerablemente de tamaño tras la segunda inmunización. Dos semanas después de la exposición a PMT nativa, los bazos de los ratones inmunizados con Tox1- y Tox2- comenzaron a atrofiarse, pero todos los ratones sobrevivieron. El mayor número de ASC se detectó en los ratones inmunizados con Tox2 que poseían $2993,33 \pm 200,33$ ASC específicas de PMR en 10^6 MNC, La cantidad más baja de ASC ($1386,67 \pm 477,21$ en 10^6 MNC) se detectó en los ratones inmunizados con el toxoide de PMT. Excepto la Tox2-, no se observaron diferencias significativas entre ratones inmunizados con Tox1-, Tox7- y toxoide ($p < 0,05$). Las ASC de los ratones inmunizados aumentaron significativamente en cada grupo tras la exposición a PMT nativa ($p \leq 0,001$)

(Fig. 3). Los ratones inmunizados con Tox1 mostraron el mayor incremento en el número de ASC con $10233,33 \pm 850,49$ en 10^6 MNC (Fig. 3).

Respuesta celular de ratones inmunizados

La respuesta inmunitaria celular anti-PMT de los ratones se analizó mediante un ensayo de proliferación de linfocitos. Los índices de estimulación media de ratones vacunados con Tox1-, Tox2-, Tox7- y toxoide fueron $2,11 \pm 0,27$, $3,31 \pm 0,95$, $2,31 \pm 0,26$ y $6,02 \pm 0,68$, respectivamente. Tras la exposición a PMT nativa, sólo las células aisladas de ratones inmunizados con Tox7- y toxoide pudieron estimularse con la PMT nativa *in vitro*. Los resultados implicaron que los ratones vacunados con las proteínas rsPMT no podían montar una respuesta celular específica contra PMT ($IE > 2$), pero la respuesta pudo inhibirse mediante la exposición a la PMT nativa (Tabla 2).

Tabla 2. Ensayo de proliferación de linfocitos de ratones inmunizados a los 14 días de la vacunación de refuerzo y dosis letal de la exposición a PMT nativa

Grupos	Vacunación de refuerzo (n= 3)	Exposición a PMT (n= 3)
Simulado	$0,99 \pm 0,26$	$,66 \pm 0,49$
Tox1	$2,11 \pm 0,27$	$1,06 \pm 0,49$
Tox2	$3,31 \pm 0,95$	$0,96 \pm 0,19$
Tox7	$2,31 \pm 0,26$	$2,8 \pm 0,37$
Toxoide	$6,02 \pm 0,68$	$8,07 \pm 4,13$

Los datos se expresaron como el índice de estimulación (*IE*).

[0036] $IE = \text{cpm en cultivos estimulados con antígeno} / \text{cpm en cultivos no estimulados con antígeno}$. Un valor de *IE* superior a 1 se consideró positivo (van Diemen y col., 1994)

Ejemplo 5. Eficacia de la protección de la vacuna de rsPMT en cerdos Respuestas de anticuerpos en lechones inmunizados

[0037] La antigenicidad de los productos de rsPMT se analizó en lechones de 4 semanas de edad analizando el nivel de células secretoras de anticuerpos específicas de PMT y los títulos de anticuerpos neutralizantes tras la inmunización, exposición a PMT o refuerzo con antígeno homólogo. Las células secretoras de anticuerpos en ganglios linfáticos del bazo y pulmonares se cuantificaron mediante el ensayo ELISPOT. Cada mancha de tinción representó una ASC específica de PMT, se cuantificó el total de manchas de color. Sólo se detectaron unas pocas ASC específicas de PMT a los 14 días de la vacunación de refuerzo en cada grupo vacunado. El mayor número de ASC específicas de PMT en el bazo se detectó en lechones inmunizados con Tox7 que tenían $11,5 \pm 0,7$ ASC por 10^6 MNC (véase la Fig. 4B) y el mayor número de ASC específicas de PMT en los ganglios linfáticos se demostró en el grupo de Tox1 (Fig. 4A). Las cantidades de ASC aumentaron ligeramente a las 4 semanas de la exposición a PMT auténtica, pero aumentaron espectacularmente en el grupo de refuerzo con antígeno homólogo. Los lechones inmunizados con Tox1 mostraron el mayor incremento en las ASC con $493,3 \pm 138,7$ por 10^6 MNC en ganglios linfáticos pulmonares y los lechones inmunizados con Tox7 poseían el mayor incremento en las ASC con $440 \pm 104,4$ por 10^6 MNC en MNC de bazo tras el refuerzo con el antígeno (mostrado en la Fig. 4).

[0038] Además, el título de anticuerpos neutralizantes específicos de PMT se determinó como su capacidad para inhibir los efectos citopáticos inducidos por PMT en células Vero. Tras la vacunación de refuerzo se detectaron niveles moderados del título de anticuerpos neutralizantes ($\geq 1:16$) en cerdos inmunizados con Tox1 y Tox7, y se detectaron niveles bajos de del título de anticuerpos neutralizantes (1:4) en el grupo de Tox2. Los títulos de anticuerpos neutralizantes aumentaron significativamente tras la exposición de PMT o el refuerzo con el antígeno de rsPMT homólogo, pero no en el grupo vacunado con el toxoide de PMT. Los cerdos inmunizados con Tox1 pudieron generar los niveles de títulos de anticuerpos neutralizantes más elevados en cada punto de ensayo y los cerdos inmunizados con Tox7 fueron los siguientes. No se detectaron anticuerpos neutralizantes en cerdos no vacunados. En resumen, tras la exposición a PMT o el refuerzo con el antígeno homólogo, los títulos de anticuerpos neutralizantes en cerdos inmunizados con la subunidad recombinante de PMT pudieron alcanzar 1:32 a 1:512, pero sólo 1:8 de cerdos inmunizados con el toxoide de PMT (Fig. 5).

Respuesta inmunitaria celular en ratones inmunizados

[0039] La respuesta inmunitaria celular específica a cada subunidad recombinante de PMT se analizó mediante el ensayo de proliferación de linfocitos. La proliferación de linfocitos se midió y presentó como el índice de estimulación (*IE*). Tras la vacunación de refuerzo se observó proliferación de linfocitos específicos de PMT en los cerdos vacunados con Tox2 and Tox7, como indica un *IE* superior a 2, mientras que no se detectó respuesta en los ganglios linfáticos pulmonares. Tras la exposición a PMT o el refuerzo con antígeno homólogo, las MNC de bazo de cada grupo inmunizado con rsPMT o toxoide mostraron una potenciación significativa de la proliferación de linfocitos (Tabla 3). A excepción de los cerdos inmunizados con Tox1, las MNC de ganglios linfáticos pulmonares de cada

grupo también mostraron una respuesta de proliferación específica tras el refuerzo con antígeno homólogo.

Tabla 3 Proliferación de linfocitos específicos de PMT en MNC de ganglios linfáticos pulmonares (PLN) y de bazo aislados de lechones inmunizados tras la vacunación de refuerzo, expuestos a PMT y reforzados antígeno homólogo

Grupo (Antígeno de vacunación)	Vacunación		Expuestos a PMT		Refuerzo con el antígeno homólogo	
	PLN	Bazo	PLN	Bazo	PLN	Bazo
Tox1	1,1	1,0	1,2	5,6	1,8	4,8
Tox2	1,2	4,0	1,9	4,9	3,1	5,1
Tox7	1,4	3,4	1,4	3,5	4,2	4,6
Toxoide	1,5	1,8	1,0	6,9	4,0	5,6

Los datos son la media del índice de estimulación (*IE*) de la proliferación de linfocitos específicos de PMT de tres cerdos en cada punto de tiempo. El *IE* se calculó como se ha descrito en Materiales y Procedimientos y un *IE* > 2 representa la proliferación de linfocitos.

Eficacia de la protección de la vacuna con rsPMT en lechones

[0040] Para evaluar la eficacia de la protección de estos rsPMT en lechones neonatos se aplicó para comparación inmunización de las cerdas preñadas con una mezcla de rsPMT con o sin bacterina de *P. multocida* de tipo A y una vacuna del toxoide de la RAP convencional. Los títulos de anticuerpos neutralizantes en calostro de cerdas se sometieron a ensayo en el parto y los títulos de anticuerpos neutralizantes maternos en el suero de la descendencia se analizaron al día de edad. Las cerdas preñadas vacunadas con rsPMT a las que se administró (grupo A) o no se administró (grupo B) una inyección de bacterina de *P. multocida* tipo A pudieron montar una respuesta significativa con títulos de anticuerpos neutralizantes altos en el calostro ($\geq 1:80$) que se transfirieron con éxito a lechones neonatos (Tabla 4). Las cerdas inmunizadas en el grupo A demostraron una respuesta de anticuerpos más elevada que las del grupo B. Por el contrario, la vacuna del toxoide para RA convencional (Grupo C) indujo un nivel medio de anticuerpos neutralizantes que conducen a títulos de anticuerpos bajos en su descendencia (1:8). Se detectaron únicamente niveles basales del título de anticuerpos neutralizantes ($\geq 1:4$) en los animales control (grupo D). Además, diez descendientes de cada grupo, a los 14 días de edad fueron expuestos mediante inyección intramuscular a 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (5 veces la dosis letal) de PMT auténtica. La muerte de los lechones se observó ya a las 24 horas de la inoculación en los grupos C y D, pero no hasta los 4 días después de la inoculación en los grupos A y B. Los índices de supervivencia de los descendientes de los grupos C y D fueron 0%, pero alcanzaron el 60 % en los grupos A y B a los 28 días de edad (Tabla 4).

Tabla 4. Títulos de anticuerpos neutralizantes de cerdas inmunizadas y su descendencia y el índice de supervivencia tras la exposición a 5 veces la dosis letal (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) de PMT auténtica a los 14 días de edad

Grupo	Composición de la vacuna	Título medio de anticuerpos neutralizantes			Índice supervivencia ^a
		Cerdas	Neonatos	Lechones	
		Calostros	1 día de edad	28 días de edad	
A	rsPMT + bacterina de <i>P.</i> <i>multocida</i>	1:101	1:102	1:2	60%
B	rsPMT convencionales	1:80	1:79	1:2	60%
C	Vacuna con toxoide de la RA	1:39	1:8	ND ^b	0%
D	Sin vacunar	1 :4	1:2	ND ^b	0%

^aEl índice de supervivencia se calculó a los 28 días de edad.

^bNo determinado, todos los lechones habían muerto a las 24 horas de la exposición a PMT.

[0041] Además, otros veinte descendientes de cada grupo se analizaron según su ganancia de peso. La mitad de los lechones de cada grupo fueron expuestos a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (dosis subletal) de PMT auténtica mediante inyección intramuscular a los 14 días de edad y la mitad restante se dejó sin tratar. La ganancia media de peso corporal de los

lechones se registró a los 14 días de la inoculación. No se observaron diferencias significativas entre los lechones de tres grupos de vacunación, expuestos o no expuestos, pero se observó una reducción significativa de la ganancia de peso ($p < 0,05$) entre los lechones del grupo control D expuestos a PMT auténtica en comparación con la cohorte sin tratar (Tabla 5). En la exploración macroscópica conchal nasal se observaron niveles bajos de atrofia de la turbinada con puntuaciones que variaron de 0,1 a 0,3 en los lechones de cerdas vacunadas con rsPMT, incluso después de que estos lechones fueran expuestos a PMT auténtica. En contraste con ello, tras la exposición a PMT auténtica, los lechones de las cerdas vacunadas a toxoide de la RA convencional y de cerdas no vacunadas mostraron atrofia turbinada de leve a grave con puntuaciones medias de 1,4 y 3,4, respectivamente (véase la Tabla 5; y la Fig. 6), que fueron significativamente diferentes de los grupos vacunados con rsPMT ($p < 0,05$).

Tabla 5. Ganancia media de peso y puntuación conchal turbinada de los lechones descendientes tras 2 semanas de exposición a una dosis subletal (30 µg/kg) de PMT auténtica

Grupo de cerdas	Composición de la vacuna	Ganancia media de peso de lechones (media ± SD) (kg)		Puntuación media de la atrofia conchal turbinada ^a	
		No expuestos	Expuestos	No expuestos	No expuestos
A	rsPMT + bacterina de P. multocida	3,9 ± 0,8	3,5 ± 0,4	0,1	0,2
B	rsPMT convencionales	5,0 ± 0,6	4,5 ± 1,3	0,2	0,3
C	Vacuna con toxoide de la RA	4,4 ± 1,0	3,5 ± 0,9	0,2	1,4 [#]
D	Sin vacunar	5,2 ± 0,3	3,5 ± 0,8*	0,2	3,4 [#]

^a Los grados de atrofia conchal turbinada variaron de 0 (normal) a 4 (atrofia completa)

* La ganancia media diaria de peso en el grupo control difiere significativamente (prueba t, $p < 0,05$)

La puntuación media de la atrofia conchal turbinada en el grupo control difiere significativamente (prueba t, $p < 0,05$)

[0042] No se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso entre los subgrupos expuestos a toxinas y no expuestos, pero los lechones de cerdas no vacunadas mostraron un crecimiento pero tras la exposición a PMT que los no expuestos ($p < 0,05$). Además, los lechones de cerdas vacunadas con una mezcla de rsPMT con o sin bacterina de P. multocida de tipo A exhibieron niveles bajos de atrofia conchal turbinada tras la exposición a PMT auténtica. En contraste con ello, los lechones de cerdas vacunadas con el toxoide de RAP convencional y no vacunadas mostraron una atrofia significativa de la concha turbinada. Estos resultados indicaron que una vacunación eficaz de cerdas durante el embarazo podía proteger a la descendencia contra la RAP.

[0043] en conclusión, la vacunación con fragmentos cortos de proteínas de PMT subunidades recombinantes tuvo como resultado niveles altos de anticuerpos neutralizantes y una respuesta inmunitaria celular específica contra PMT en cerdas. La inmunización de cerdas con la vacuna de PMT subunidades recombinantes durante el embarazo es segura y puede producir niveles de anticuerpos neutralizantes en calostro que podían proteger a su descendencia contra PMT. Estas proteínas PMT subunidades recombinantes no tóxicas conservan un gran potencial como antígenos adecuados para desarrollar una vacuna de subunidades eficaz contra la RAP.

Ejemplo 6. Preparación de la prueba de inmunogenicidad de la vacuna bivalente (RAP-PR) contra la rinitis atrófica progresiva y la seudorabia

La vacuna para la RAP (que comprenden 2,1 mg de proteínas de subunidades recombinantes de PMT, cada una 0,7 mg, 1×10^9 UFC de P. multocida inactivada de serotipo D) se mezcló con el virus de la seudorabia sin gE inactivado (10^8 DICT₅₀), y, después, se añadió adyuvante oleoso estéril (de tipo A/Ac/A) o gel de aluminio se añadió a la mezcla para formar una formulación de vacuna bivalente RAP-PP de una dosis de 2 ml y de 4 ml.

Inmunoprotección de la vacuna bivalente de RAP-PR en cerdas preñadas

[0045] Las cerdas preñadas se inmunizaron mediante inyección intramuscular de la formulación de la vacuna bivalente RAP-PR que comprende gel de aluminio o adyuvante oleoso en dosis de 2 ml o 4 ml, respectivamente, y se extrajeron muestras de sangre para la detección de títulos de anticuerpos neutralizantes en suero específicos de PMT y de PR. Como se muestra en las Fig. 7 y 8, los títulos medios de anticuerpos neutralizantes en suero específicos de PMT y de PR observados en cerdas inmunizadas con la vacuna bivalente que contiene gel de aluminio a dosis de 2 ml fueron 88,4- y 90,4-veces respectivamente y de 75,2 y 99,2-veces los observados en las

cerdas tratadas con la dosis de 4 ml. De la observación en los animales tratados con la vacuna bivalente que contiene el adyuvante oleoso, los títulos medios de anticuerpos neutralizantes específicos de PMT y de PR detectados fueron 88,8- y 92,8 veces en los grupos tratados con la dosis de 2 ml, respectivamente. En los grupos tratados con la dosis de 4 ml, el título medio de anticuerpos neutralizantes para PMT detectado fue 101,2 veces y el título de anticuerpos neutralizantes para RP fue 110,5 veces.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

[0046]

- 5 <110> National Chung-Hsing University
- <120> Vacuna para prevenir y tratar la rinitis atrófica progresiva porcina
- <130> CP-19850
- <160> 13
- <170> PatentIn versión 3.2
- 10 <210> 1
- <211> 4380
- <212> ADN
- <213> *Pasteurella multocida*
- <220>
- 15 <221> CDS
- <222> (219)..(4076)
- <400> 1

```

aacaaggaa aatagctaga ttagacgata tcgataatat cataaataat atttaaaat      60
tacgcccctt gacctagagg ggcttttta ttacatcaaa aaaataaacc caaacactgc      120
gaatgtttgg ggtttattt ataacaaaa tacattaata tgttattaa gtaagcatta      180
tcttacttta ggaataaact aacatagagg ttatggat atg aaa aca aaa cat ttt      236
                                     Met Lys Thr Lys His Phe
                                     1           5
ttt aac tca gat ttt act gta aaa gga aaa agt gcc gat gaa att ttt      284
Phe Asn Ser Asp Phe Thr Val Lys Gly Lys Ser Ala Asp Glu Ile Phe
                                     10           15           20
aga aga ttg tgt act gat cat cct gac aag caa tta aac aat gta aaa      332
Arg Arg Leu Cys Thr Asp His Pro Asp Lys Gln Leu Asn Asn Val Lys

```

25	30	35	
tgg aaa gaa gtt ttt att aat cgt ttt ggt cag atg atg cta gat act			380
Trp Lys Glu Val Phe Ile Asn Arg Phe Gly Gln Met Met Leu Asp Thr			
40	45	50	
cct aat ccg aga aag att gta gaa aaa att att aat gaa ggg ctt gaa			428
Pro Asn Pro Arg Lys Ile Val Glu Lys Ile Ile Asn Glu Gly Leu Glu			
55	60	65	70
aaa caa ggc ctg aaa aat ata gat cct gaa act aca tat ttc aac att			476
Lys Gln Gly Leu Lys Asn Ile Asp Pro Glu Thr Thr Tyr Phe Asn Ile			
	75	80	85
ttt tca tct tct gac agc tcc gat ggg aac gtt ttt cat tat aac tct			524
Phe Ser Ser Ser Asp Ser Ser Asp Gly Asn Val Phe His Tyr Asn Ser			
90	95	100	
tta tca gaa tcc tat cga gtt act gat gcc tgc cta atg aat att ttt			572
Leu Ser Glu Ser Tyr Arg Val Thr Asp Ala Cys Leu Met Asn Ile Phe			
105	110	115	
gtg gag cgt tat ttt gat gat tgg gac ttg cta aat agc tta gcc agt			620
Val Glu Arg Tyr Phe Asp Asp Trp Asp Leu Leu Asn Ser Leu Ala Ser			
120	125	130	
aat gga ata tat tca gta gga aaa gaa gga gct tat tat cct gat cat			668
Asn Gly Ile Tyr Ser Val Gly Lys Glu Gly Ala Tyr Tyr Pro Asp His			
135	140	145	150
gat tat ggt cca gaa tat aac cct gtt tgg gga cca aac gaa caa att			716
Asp Tyr Gly Pro Glu Tyr Asn Pro Val Trp Gly Pro Asn Glu Gln Ile			

155	160	165	
tac cat tct aga gtg att gca gat atc ctt tat gct cgc tcc gta tgg			764
Tyr His Ser Arg Val Ile Ala Asp Ile Leu Tyr Ala Arg Ser Val Trp			
170	175	180	
gat gaa ttt aaa aaa tac ttc atg gag tat tgg caa aaa tat gct cag			812
Asp Glu Phe Lys Lys Tyr Phe Met Glu Tyr Trp Gln Lys Tyr Ala Gln			
185	190	195	
ctt tat acc gaa atg tta tct gat aca ttt ctt gca atg gct att cag			860
Leu Tyr Thr Glu Met Leu Ser Asp Thr Phe Leu Ala Met Ala Ile Gln			
200	205	210	
caa tat aca cga caa acg ctt act gat gaa ggc ttt ctt atg gtt tgt			908
Gln Tyr Thr Arg Gln Thr Leu Thr Asp Glu Gly Phe Leu Met Val Cys			
215	220	225	230
aac aca tat tat ggc aat aag gaa gaa gtt caa ata act cta cta gat			956
Asn Thr Tyr Tyr Gly Asn Lys Glu Glu Val Gln Ile Thr Leu Leu Asp			
235	240	245	
atc tat gga tac cct tcc act gat ata att tgt ala gag caa aaa ggg			1004
Ile Tyr Gly Tyr Pro Ser Thr Asp Ile Ile Cys Ile Glu Gln Lys Gly			
250	255	260	
ctt cct act cct aaa gtg ata ctt tac att cct gga gga aca caa cca			1052
Leu Pro Thr Pro Lys Val Ile Leu Tyr Ile Pro Gly Gly Thr Gln Pro			
265	270	275	
ttt gtt gaa ttt ctt aat aca gat gat ctg aaa caa tgg att gca tgg			1100
Phe Val Glu Phe Leu Asn Thr Asp Asp Leu Lys Gln Trp Ile Ala Trp			
280	285	290	

cat ita aaa gat aac aaa cat atg gtc cga ttc cgc aaa cat ttc tcg 1148
 His Leu Lys Asp Asn Lys His Met Val Arg Phe Arg Lys His Phe Ser
 295 300 305 310
 cta aaa caa cgt cag gaa gga gaa acg ttt aca ggt ala gat aaa gca 1196
 Leu Lys Gln Arg Gln Glu Gly Glu Thr Phe Thr Gly Ile Asp Lys Ala
 315 320 325
 ctt caa tat att gca gaa gag tcc cct gaa tgg cct gcc aat aaa tac 1244
 Leu Gln Tyr Ile Ala Glu Glu Ser Pro Glu Trp Pro Ala Asn Lys Tyr
 330 335 340
 atc ctt tat aat ccg aca cat tta gaa aca gaa aat tta ttt aac atc 1292
 Ile Leu Tyr Asn Pro Thr His Leu Glu Thr Glu Asn Leu Phe Asn Ile
 345 350 355
 atg atg aag cga aca gaa cag cgg atg ctt gaa gat agt gat gta cag 1340
 Met Met Lys Arg Thr Glu Gln Arg Met Leu Glu Asp Ser Asp Val Gln
 360 365 370
 att aga tca aat tca gaa gct acc cgt gac tat gct ctt tca tta ctc 1388
 Ile Arg Ser Asn Ser Glu Ala Thr Arg Asp Tyr Ala Leu Ser Leu Leu
 375 380 385 390
 gaa acc ttt att tca cag tta tct gca ata gat atg tta gta cca gca 1436
 Glu Thr Phe Ile Ser Gln Leu Ser Ala Ile Asp Met Leu Val Pro Ala
 395 400 405
 gta ggt atc cca att aat ttt gcc cta tca gct aca gca tta gga ctt 1484
 Val Gly Ile Pro Ile Asn Phe Ala Leu Ser Ala Thr Ala Leu Gly Leu
 410 415 420
 agc tcg gat att gla gtt aat gga gat tca tat gaa aag aga aaa tat 1532

Ser Ser Asp Ile Val Val Asn Gly Asp Ser Tyr Glu Lys Arg Lys Tyr
 425 430 435
 gga att ggg tcc tta gtg caa tct gca tta ttc aca gga att aat ctt 1580
 Gly Ile Gly Ser Leu Val Gln Ser Ala Leu Phe Thr Gly Ile Asn Leu
 440 445 450
 att cca gtt att tgg gaa acc gca gaa att tta tct tct ttc tct aga 1628
 Ile Pro Val Ile Ser Glu Thr Ala Glu Ile Leu Ser Ser Phe Ser Arg
 455 460 465 470
 aca gaa gaa gat att cca gct ttt ttc act gaa gaa caa gct tta gct 1676
 Thr Glu Glu Asp Ile Pro Ala Phe Phe Thr Glu Glu Gln Ala Leu Ala
 475 480 485
 caa cgc ttt gaa ata gta gaa gaa gaa tta cat tct atc tca cct gat 1724
 Gln Arg Phe Glu Ile Val Glu Glu Glu Leu His Ser Ile Ser Pro Asp
 490 495 500
 gat cct cct cga gaa att act gac gaa aat tta cat aaa att cgt ctg 1772
 Asp Pro Pro Arg Glu Ile Thr Asp Glu Asn Leu His Lys Ile Arg Leu
 505 510 515
 gta cgt ctt aac aat gaa aat caa cct tta gtt gtg tta cga aga tta 1820
 Val Arg Leu Asn Asn Glu Asn Gln Pro Leu Val Val Leu Arg Arg Leu
 520 525 530
 gga gga aat aaa ttt atc aga atc gag cct ata aca ttc cag gaa ata 1868
 Gly Gly Asn Lys Phe Ile Arg Ile Glu Pro Ile Thr Phe Gln Glu Ile
 535 540 545 550
 aaa ggt tct tta gta agt gaa gtt ata aat cca gtg act aat aaa acg 1916
 Lys Gly Ser Leu Val Ser Glu Val Ile Asn Pro Val Thr Asn Lys Thr

555	560	565	
tac tac gta agc aat gct aaa cta tta ggg ggc tct cct tat agt cct			1964
Tyr Tyr Val Ser Asn Ala Lys Leu Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Ser Pro			
570	575	580	
ttc cgt att gga tta gaa ggt gtt tgg aca cca gag gta tta aaa gca			2012
Phe Arg Ile Gly Leu Glu Gly Val Trp Thr Pro Glu Val Leu Lys Ala			
585	590	595	
aga gct tcc gtt att gga aag cct att gga gaa tca tat aaa aga ata			2060
Arg Ala Ser Val Ile Gly Lys Pro Ile Gly Glu Ser Tyr Lys Arg Ile			
600	605	610	
tta gcc aaa cta caa aga ata cat aac agt aat atc tta gat gag cga			2108
Leu Ala Lys Leu Gln Arg Ile His Asn Ser Asn Ile Leu Asp Glu Arg			
615	620	625	630
caa ggt tta atg cat gaa ctc atg gag ctt att gat ctt tat gaa gaa			2156
Gln Gly Leu Met His Glu Leu Met Glu Leu Ile Asp Leu Tyr Glu Glu			
635	640	645	
tcg caa cct tct tca gag cgt ttg aat gct ttt cgt gaa ctg cgt act			2204
Ser Gln Pro Ser Ser Glu Arg Leu Asn Ala Phe Arg Glu Leu Arg Thr			
650	655	660	
caa tta gaa aaa gcg ctt tat ctt cct gaa atg gaa gca tta aaa aaa			2252
Gln Leu Glu Lys Ala Leu Tyr Leu Pro Glu Met Glu Ala Leu Lys Lys			
665	670	675	
caa ata cta cag att cct aac aaa ggt tct ggt gcc gct cga ttt tta			2300
Gln Ile Leu Gln Ile Pro Asn Lys Gly Ser Gly Ala Ala Arg Phe Leu			
680	685	690	

ctt cgt aca gcc atg aat gaa atg gct gga aaa acc agt gaa agc acg 2348
 Leu Arg Thr Ala Met Asn Glu Met Ala Gly Lys Thr Ser Glu Ser Thr
 695 700 705 710
 gct gat tta ata cgc ttt gcc ttg caa gat aca gta att tca gcg cct 2396
 Ala Asp Leu Ile Arg Phe Ala Leu Gln Asp Thr Val Ile Ser Ala Pro
 715 720 725
 ttt cgc gga tat gct ggt gcg att cca gag gca ata gac ttt cct gta 2444
 Phe Arg Gly Tyr Ala Gly Ala Ile Pro Glu Ala Ile Asp Phe Pro Val
 730 735 740
 aaa tat gta ata gaa gac ata tct gta ttt gat aaa ata cag aca aat 2492
 Lys Tyr Val Ile Glu Asp Ile Ser Val Phe Asp Lys Ile Gln Thr Asn
 745 750 755
 tac tgg gaa ctt cct gct tat gaa agc tgg aac gaa gga agt aat agc 2540
 Tyr Trp Glu Leu Pro Ala Tyr Glu Ser Trp Asn Glu Gly Ser Asn Ser
 760 765 770
 cga tta ctg cct ggt ttg tta cgt gaa tcg caa agc aag ggg atg tta 2588
 Arg Leu Leu Pro Gly Leu Leu Arg Glu Ser Gln Ser Lys Gly Met Leu
 775 780 785 790
 agt aag tgt cgt atc ata gaa aat agc ctt tat att gga cat agc tat 2636
 Ser Lys Cys Arg Ile Ile Glu Asn Ser Leu Tyr Ile Gly His Ser Tyr
 795 800 805
 gaa gaa atg ttt tac agc att tct cca tat tca aac cag gtt gga ggg 2684
 Glu Glu Met Phe Tyr Ser Ile Ser Pro Tyr Ser Asn Gln Val Gly Gly
 810 815 820
 cct tat gaa tta tat cct ttc act ttt ttc agt atg ctt caa gaa gta 2732

Pro Tyr Glu Leu Tyr Pro Phe Thr Phe Phe Ser Met Leu Gln Glu Val
 825 830 835
 caa ggt gat tta gga ttt gag cag gcc ttt gcc aca cgt aac ttt ttc 2780
 Gln Gly Asp Leu Gly Phe Glu Gln Ala Phe Ala Thr Arg Asn Phe Phe
 840 845 850
 aat act ctt gtt tct gat cga cta tcc tta atg gaa aat acg atg tta 2828
 Asn Thr Leu Val Ser Asp Arg Leu Ser Leu Met Glu Asn Thr Met Leu
 855 860 865 870
 ctt aca gaa agt ttt gat tat aca cct tgg gat gct att tat gga gat 2876
 Leu Thr Glu Ser Phe Asp Tyr Thr Pro Trp Asp Ala Ile Tyr Gly Asp
 875 880 885
 att aat tat gat gaa caa ttt gct gca atg tct att aat gaa cgc ata 2924
 Ile Asn Tyr Asp Glu Gln Phe Ala Ala Met Ser Ile Asn Glu Arg Ile
 890 895 900
 gaa aaa tgt atg aat acc tat aga ggt gtg gca ttc caa aac tct tca 2972
 Glu Lys Cys Met Asn Thr Tyr Arg Gly Val Ala Phe Gln Asn Ser Ser
 905 910 915
 aaa agt att gac ttt ttc cta aat aat cta acc aca ttc att gat aat 3020
 Lys Ser Ile Asp Phe Phe Leu Asn Asn Leu Thr Thr Phe Ile Asp Asn
 920 925 930
 gga cta acc gaa att gct ata tct gat tta ccg tat gat att glg caa 3068
 Gly Leu Thr Glu Ile Ala Ile Ser Asp Leu Pro Tyr Asp Ile Val Gln
 935 940 945 950
 caa gaa atc tct caa ttc tta caa gga agt aat gaa tgg aaa aca ctt 3116
 Gln Glu Ile Ser Gln Phe Leu Gln Gly Ser Asn Glu Trp Lys Thr Leu

955	960	965	
gat gcc atg tta ttt aac tta gat aaa gga gat att aat ggt gct ttc			3164
Asp Ala Met Leu Phe Asn Leu Asp Lys Gly Asp Ile Asn Gly Ala Phe			
970	975	980	
aga aag ctt ctg caa tca gca aaa gat aat aat ata aaa ttt aga gct			3212
Arg Lys Leu Leu Gln Ser Ala Lys Asp Asn Asn Ile Lys Phe Arg Ala			
985	990	995	
ata ggg cat tca gat aat tct gtt ccg cca ttt aat aac cct tat			3257
Ile Gly His Ser Asp Asn Ser Val Pro Pro Phe Asn Asn Pro Tyr			
1000	1005	1010	
aag tct tta tat tat aaa gga aat ata ata gct gaa gca att gaa			3302
Lys Ser Leu Tyr Tyr Lys Gly Asn Ile Ile Ala Glu Ala Ile Glu			
1015	1020	1025	
aaa cta gat cga gaa ggt caa aaa ttt gtt gta ttt gct gat agt			3347
Lys Leu Asp Arg Glu Gly Gln Lys Phe Val Val Phe Ala Asp Ser			
1030	1035	1040	
tct ctg ctc aac agc acg cct ggg aca ggt cgt cct atg cca gga			3392
Ser Leu Leu Asn Ser Thr Pro Gly Thr Gly Arg Pro Met Pro Gly			
1045	1050	1055	
cta gtt caa tat tta aaa ata cca gca act gta gta gal agc gat			3437
Leu Val Gln Tyr Leu Lys Ile Pro Ala Thr Val Val Asp Ser Asp			
1060	1065	1070	
ggg gca tgg caa ttt ctt cca gat gla gct tca agc aga gtt cct			3482
Gly Ala Trp Gln Phe Leu Pro Asp Val Ala Ser Ser Arg Val Pro			
1075	1080	1085	

att gaa git aca gag tta gaa aat tgg caa gtc tta act cct cca 3527
 Ile Glu Val Thr Glu Leu Glu Asn Trp Gln Val Leu Thr Pro Pro
 1090 1095 1100
 caa ggt aag att ctt gga tta aag caa ttt aag tta acg gca ggt 3572
 Gln Gly Lys Ile Leu Gly Leu Lys Gln Phe Lys Leu Thr Ala Gly
 1105 1110 1115
 ttt cca aca gaa caa agt cgc tta cct ctt tta gag aat tcg gtt 3617
 Phe Pro Thr Glu Gln Ser Arg Leu Pro Leu Leu Glu Asn Ser Val
 1120 1125 1130
 tct gaa gat tta agg gaa gaa tta atg caa aag att gat gca ata 3662
 Ser Glu Asp Leu Arg Glu Glu Leu Met Gln Lys Ile Asp Ala Ile
 1135 1140 1145
 aaa aat gat gtg aaa atg aat agt tta gtg tgt atg gaa gct ggc 3707
 Lys Asn Asp Val Lys Met Asn Ser Leu Val Cys Met Glu Ala Gly
 1150 1155 1160
 tct tgt gat tca gta agc cct aag gta gct gcc cgt ctt aaa gat 3752
 Ser Cys Asp Ser Val Ser Pro Lys Val Ala Ala Arg Leu Lys Asp
 1165 1170 1175
 atg ggg tta gaa gct ggg atg ggt gct tct att acc tgg tgg aga 3797
 Met Gly Leu Glu Ala Gly Met Gly Ala Ser Ile Thr Trp Trp Arg
 1180 1185 1190
 cgt gaa ggc ggg atg gaa ttt tca cat cag atg cat act act gct 3842
 Arg Glu Gly Gly Met Glu Phe Ser His Gln Met His Thr Thr Ala
 1195 1200 1205
 tcc ttt aaa ttt gct ggt aaa gag ttt gcc gtg gat gct tca cat 3887

Ser Phe Lys Phe Ala Gly Lys Glu Phe Ala Val Asp Ala Ser His
 1210 1215 1220
tta caa ttt gta cac gac caa tta gat aca act atc ctg ata cta 3932
Leu Gln Phe Val His Asp Gln Leu Asp Thr Thr Ile Leu Ile Leu
 1225 1230 1235
cct gta gat gat tgg gct tta gaa ata gct caa aga aat cgg gct 3977
Pro Val Asp Asp Trp Ala Leu Glu Ile Ala Gln Arg Asn Arg Ala
 1240 1245 1250
att aat cct ttt gtg gaa tat gtt agt aaa aca gga aac atg tta 4022
Ile Asn Pro Phe Val Glu Tyr Val Ser Lys Thr Gly Asn Met Leu
 1255 1260 1265
gca ctc ttc atg cct cct ctt ttc aca aag cct cgc tta aca aga 4067
Ala Leu Phe Met Pro Pro Leu Phe Thr Lys Pro Arg Leu Thr Arg
 1270 1275 1280
gca cta taa ctaattaa actgtattaa agccttat tataaggctt 4116
Ala Leu
 1285
taatttctt tcaagaatta ttaagtagaa gaatcaaaat caatgagata gataaaatca 4176
aatgttatta ccaatacaac tttcttaagt atacttttg aatttttgc gtaataaat 4236
ttataatacc cttaacicaa taaaagaagt tattgagaag tttaaatctt gtgagcaaga 4296
tgaagalata attcagcaa tcaatcttat lagcgcttca tatagaaggg ctgtggatgc 4356
agtggaacaa agattcgggt ctgag 4380

- <210> 2
- <211> 1285
- <212> PRT
- <213> *Pasteurella multocida*
- <400> 2

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

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

370 375 380
 Tyr Ala Leu Ser Leu Leu Glu Thr Phe Ile Ser Gln Leu Ser Ala Ile
 385 390 395 400
 Asp Met Leu Val Pro Ala Val Gly Ile Pro Ile Asn Phe Ala Leu Ser
 405 410 415
 Ala Thr Ala Leu Gly Leu Ser Ser Asp Ile Val Val Asn Gly Asp Ser
 420 425 430
 Tyr Glu Lys Arg Lys Tyr Gly Ile Gly Ser Leu Val Gln Ser Ala Leu
 435 440 445
 Phe Thr Gly Ile Asn Leu Ile Pro Val Ile Ser Glu Thr Ala Glu Ile
 450 455 460
 Leu Ser Ser Phe Ser Arg Thr Glu Glu Asp Ile Pro Ala Phe Phe Thr
 465 470 475 480
 Glu Glu Gln Ala Leu Ala Gln Arg Phe Glu Ile Val Glu Glu Glu Leu
 485 490 495
 His Ser Ile Ser Pro Asp Asp Pro Pro Arg Glu Ile Thr Asp Glu Asn
 500 505 510
 Leu His Lys Ile Arg Leu Val Arg Leu Asn Asn Glu Asn Gln Pro Leu
 515 520 525
 Val Val Leu Arg Arg Leu Gly Gly Asn Lys Phe Ile Arg Ile Glu Pro
 530 535 540
 Ile Thr Phe Gln Glu Ile Lys Gly Ser Leu Val Ser Glu Val Ile Asn
 545 550 555 560
 Pro Val Thr Asn Lys Thr Tyr Tyr Val Ser Asn Ala Lys Leu Leu Gly
 565 570 575

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

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

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

1160	1165	1170
Ala Arg	Leu Lys Asp Met Gly	Leu Glu Ala Gly Met Gly Ala Ser
1175	1180	1185
Ile Thr	Trp Trp Arg Arg Glu	Gly Gly Met Glu Phe Ser His Gln
1190	1195	1200
Met His	Thr Thr Ala Ser Phe	Lys Phe Ala Gly Lys Glu Phe Ala
1205	1210	1215
Val Asp	Ala Ser His Leu Gln	Phe Val His Asp Gln Leu Asp Thr
1220	1225	1230
Thr Ile	Leu Ile Leu Pro Val	Asp Asp Trp Ala Leu Glu Ile Ala
1235	1240	1245
Gln Arg	Asn Arg Ala Ile Asn	Pro Phe Val Glu Tyr Val Ser Lys
1250	1255	1260
Thr Gly	Asn Met Leu Ala Leu	Phe Met Pro Pro Leu Phe Thr Lys
1265	1270	1275
Pro Arg	Leu Thr Arg Ala Leu	
1280	1285	

5 <210> 3
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador directo específico de PMT
 <400> 3
 10 agaggttatg gatccgaaaa caaacattt t 31
 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 4
 atagtagaag aagaattaca 20
 20 <210> 5
 <211> 34
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 5
 5 ctaacataga ggccatggat atgaaaacaa aaca 34
 <210> 6
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 6
 acttcgtaca gccatgaatg aaatggctgg aaaa 34
 <210> 7
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 20 <400> 7
 actcaattag aaaaagcgct 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 8
 ctactacagt tgctgttatt 20
 30 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido
 <400> 9
 attgtaaga cgtaccagac ga 22
 <210> 10
 <211> 33
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 10
 45 ctcttgtaa gctagccttt gtgaaaagag gag 33
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 11
 ttctccctt aaatcttcag 20
 <210> 12
 55 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 60 <400> 12
 tcaactggtt ttccagccat ttcattcatg gc 32
 <210> 13
 <211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador random sintético

5 <400> 13

aagcggcctc

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una vacuna para inmunizar un animal contra la rinitis atrófica progresiva (RAP), que comprende una combinación de tres proteínas, cada una de ellas comprendiendo solamente un fragmento de una toxina de *Pasteurella multocida* (rsPMT), en donde el fragmento consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos de aminoácidos 2-486, 486-986 y 986-1281 de SEC ID N° 2, respectivamente.
- 10 **2.** La vacuna de la reivindicación 1, en la que los fragmentos de PMT derivan de toxinas de *Pasteurella multocida* de subunidad recombinante (rsPMT) de un aislado con serotipo D.
- 3.** La vacuna de la reivindicación 1, en la que cada fragmento de rsPMT se produce mediante tecnología de ADN recombinante.
- 15 **4.** La vacuna de la reivindicación 3, en la que cada fragmento de rsPMT se expresa en un transformante de *E. coli* con un plásmido que comprende la secuencia codificante del fragmento 2-486, 486-986 y/o 986-1281 de la toxina de *Pasteurella multocida*.
- 20 **5.** La vacuna de la reivindicación 1, que además comprende al menos un antígeno derivado del toxoide de PMT, de *Pasteurella multocida* de serotipo A, de *Pasteurella multocida* de serotipo D o de *Bordetella bronchiseptica*.
- 6.** La vacuna de la reivindicación 1, que además comprende al menos un adyuvante seleccionado de adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, gel de aluminio, adyuvante oleoso (A/Ac/A), emulsión de agua en aceite, A/Ac; emulsión de aceite en agua, Ac/A, Con A, β -glucosano y una combinación de los mismos.
- 25 **7.** Una vacuna multivalente contra la rinitis atrófica progresiva (RAP), que comprende una combinación de las tres proteínas de la reivindicación 1 como primer componente; y al menos un antígeno o epítipo asociado con otra patología animal.
- 30 **8.** La vacuna multivalente de la reivindicación 7, que comprende el virus de la seudorabia (PR) inactivado con delección de gE como segundo componente.
- 35 **9.** La vacuna multivalente de la reivindicación 7, que además comprende al menos un antígeno derivado del toxoide de PMT, de *Pasteurella multocida* de serotipo A, de *Pasteurella multocida* de serotipo D o de *Bordetella bronchiseptica*.
- 40 **10.** La vacuna multivalente de la reivindicación 7, que además comprende al menos un adyuvante seleccionado de adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, gel de aluminio, adyuvante oleoso (A/Ac/A), emulsión de agua en aceite, A/Ac; emulsión de aceite en agua, Ac/A, Con A, β -glucosano y una combinación de los mismos.
- 11.** La vacuna multivalente de la reivindicación 7, en la que los fragmentos de PMT derivan de las toxinas de *Pasteurella multocida* de subunidad recombinant (rsPMT) de un aislado con serotipo D.
- 45 **12.** La vacuna multivalente de la reivindicación 8, en la que los fragmentos de PMT y de PR se producen mediante tecnología de ADN recombinante.

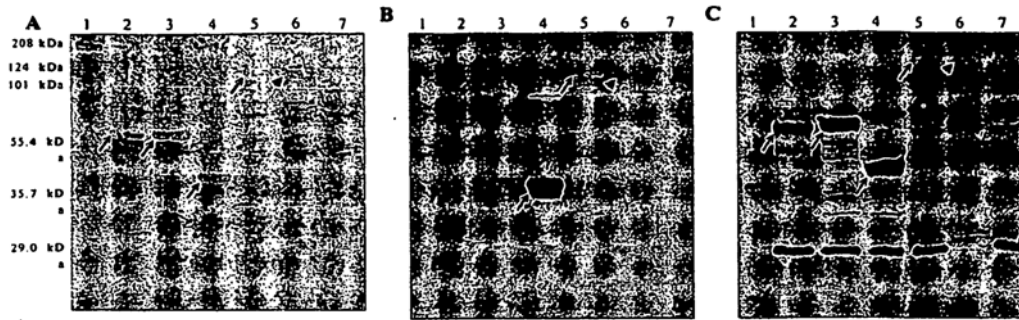


Fig. 1.

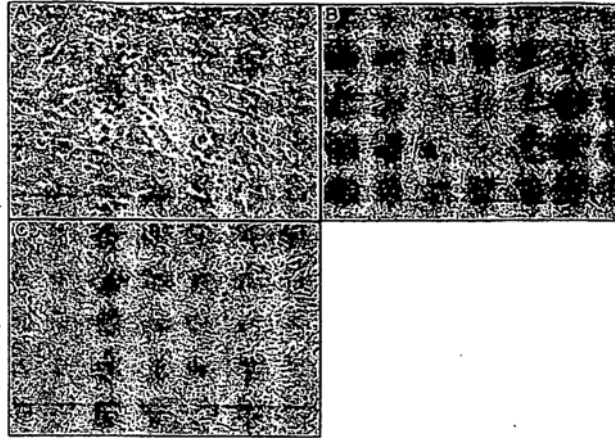


Fig. 2.

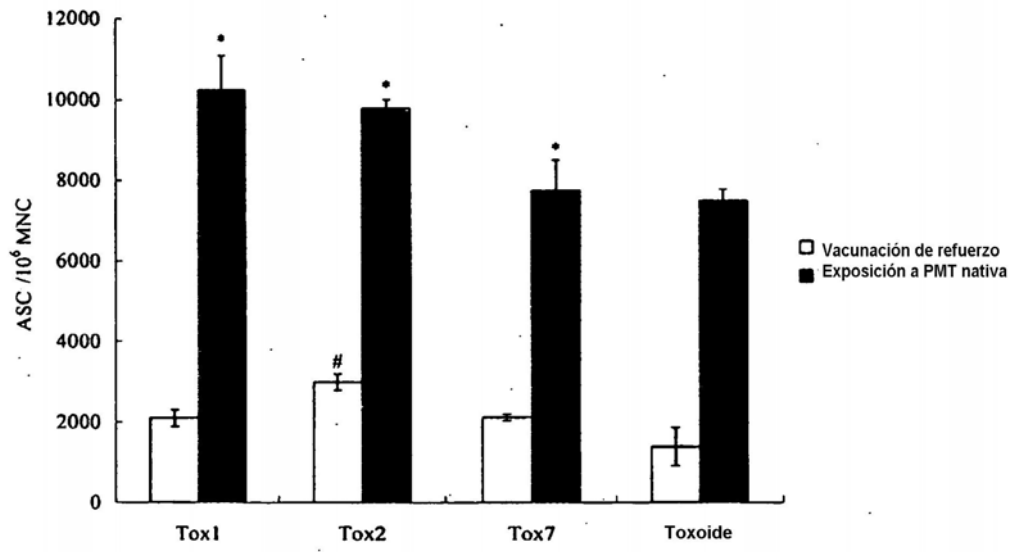


Fig. 3.

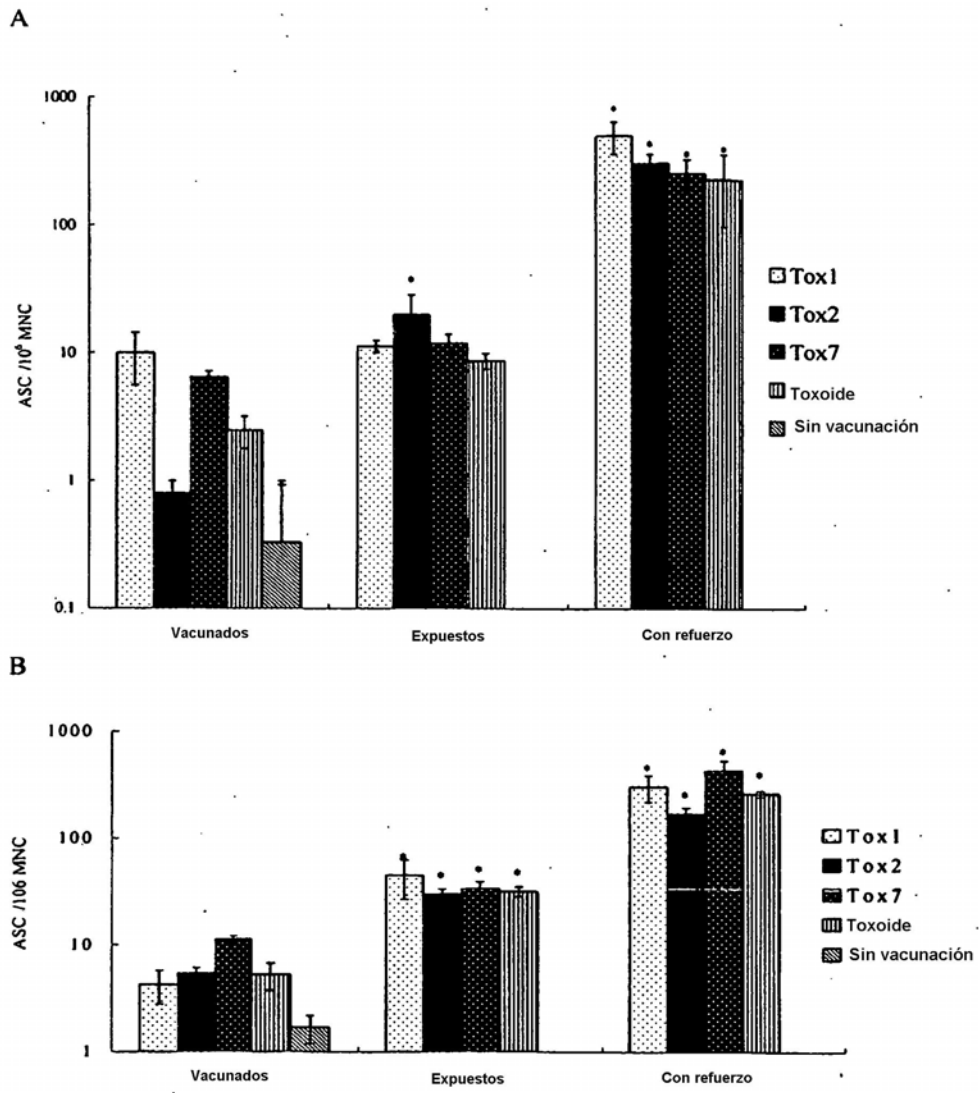


Fig. 4.

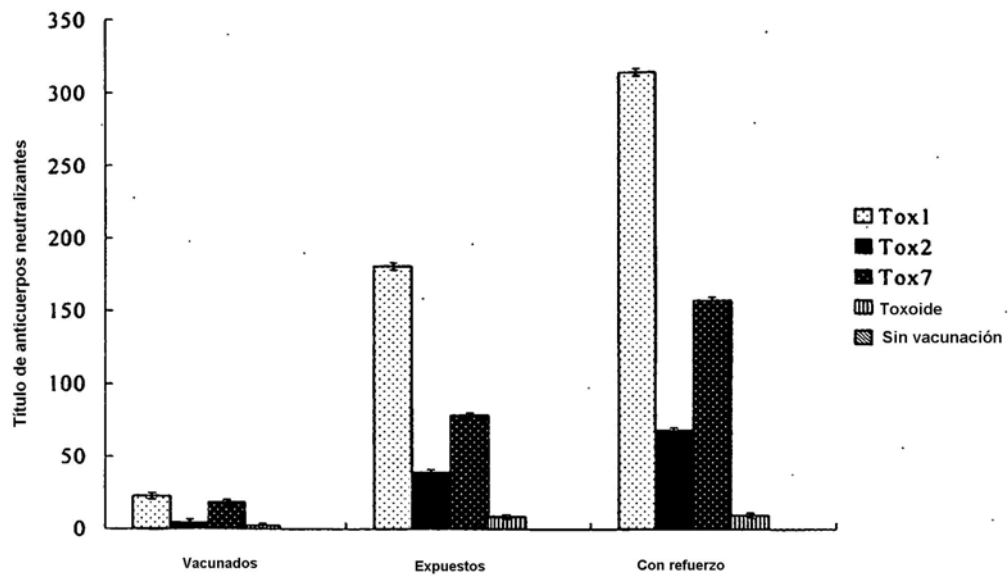


Fig. 5.

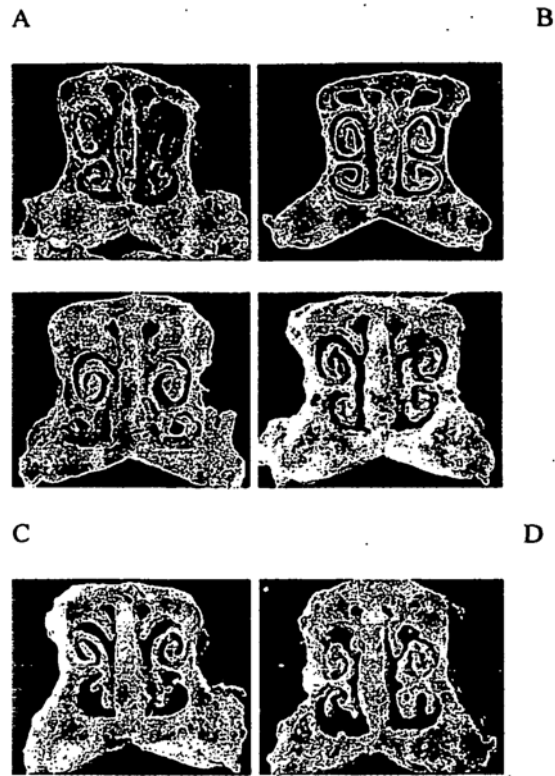


Fig. 6.

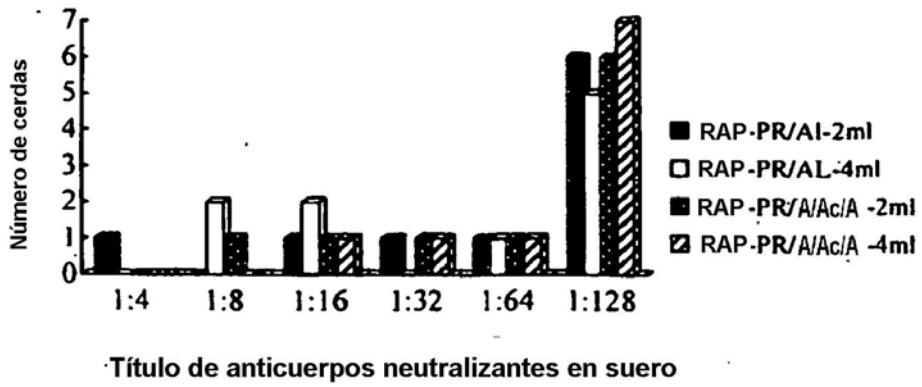


Fig.7

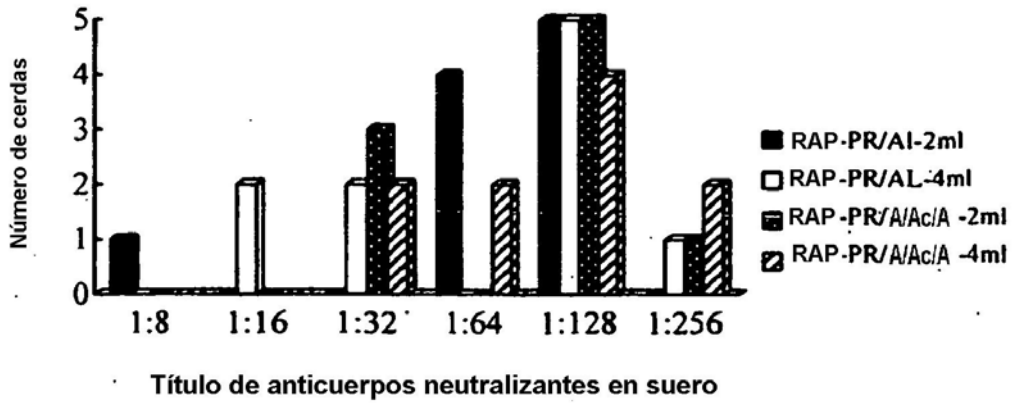


Fig.8

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • US 6110470 A [0007]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 15 • **Ackermann MR et al.** *Am J Vet Res*, 1996, vol. 57 (6), 848-852 [0002]
- **Lax AJ ; Chanter N.** *J Gen Microbiol*, 1990, vol. 136, 81-87 [0002]
- 20 • **Kamp EM ; Kimman TG.** *Am. J. Vet. Res.*, 1988, vol. 49, 1844-1849 [0002]
- **Gwaltney SM et al.** *Vet Pathol*, 1997, vol. 34 (5), 421-430 [0003]
- 25 • **Foged NT et al.** *Vet Rec*, 1989, vol. 125 (1), 7-11 [0004]
- **Kobisch M ; Pennings A.** *Vet Rec*, 1989, vol. 124 (3), 57-61 [0004]
- 30 • **Sakano T et al.** *J Vet Med Sci*, 1997, vol. 59 (1), 55-57 [0004]
- **Petersen SK ; Foged NT.** *Infect Immun*, 1989, vol. 57 (12), 3907-3913 [0005]
- **Petersen SK et al.** *Infect Immun*, 1991, vol. 59 (4), 1387-1393 [0005]
- **Nielsen JP et al.** *Can J Vet Res*, 1991, vol. 55 (2), 128-138 [0005]
- **Pullinger GD et al.** *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69, 7839-7850 [0007]
- Aluminum adjuvants. **D.E.S. Stewart-Tull.** Vaccine protocols. Farrar Human Press. Totoga, 1996, 135-139 [0020]
- **Liao CM et al.** *Taiwan Vet J*, 2002, vol. 28 (4), 281-293 [0023]
- **Nakai T et al.** *Infect Immun*, 1984, vol. 46 (2), 429-434 [0028]