

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 981**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2006 E 06790631 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 1943342**

54 Título: **Polipéptidos de Streptococcus suis y polinucleótidos codificantes de los mismos y su utilización en aplicaciones vacunales y diagnósticas**

30 Prioridad:

02.09.2005 US 713328 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.09.2016

73 Titular/es:

**VALORISATION-RECHERCHE, LIMITED
PARTNERSHIP (100.0%)
5160 Décarie Blvd., Suite 770
Montreal, QC H3X 2H9, CA**

72 Inventor/es:

**HAREL, JOSÉE;
GOTTSCHALK, MARCELO y
LI, YUANYI**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 581 981 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

Polipéptidos de *Streptococcus suis* y polinucleótidos codificantes de los mismos y su utilización en aplicaciones vacunales y diagnósticas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de *Streptococcus*. Más específicamente, la presente invención se refiere a la identificación de polipéptidos y secuencias polinucleótidas codificantes de los mismos que participan en el mecanismo patógeno de *S. suis*. La presente invención se refiere además a la utilización de dichos polipéptidos en composiciones y procedimientos para la prevención, el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades asociadas a *S. suis* e infecciones causadas por *S. suis*.

Antecedentes de la invención

Streptococcus suis es un importante patógeno del cerdo que causa muchos estados patológicos, tales como la artritis, la endocarditis, la meningitis, la neumonía y la septicemia (13, 14). También es un importante agente zoonótico para las personas en contacto con cerdos contaminados o los productos secundarios de los mismos, provocando meningitis y endocarditis (1, 36). En la actualidad se conocen treinta y tres serotipos (figuras 1 a 31, 33 y 1/2) basados en los antígenos capsulares (9-11, 15, 17, 31). El tipo 2 se considera el tipo más virulento y prevalente en cerdos enfermos. No se entienden por completo los mecanismos que participan en la patogénesis y virulencia de *S. suis* (13) y los intentos para controlar la infección se han visto dificultados por la falta de vacunas eficaces.

Se han seguido varios enfoques en el desarrollo de vacunas para *S. suis*. Sin embargo, se ha tenido poco éxito debido a que la protección dependía del serotipo o la cepa y los resultados, en la mayoría de casos, eran ambiguos (16, 30). Por ejemplo, se ha informado de cierta protección con células completas muertas y vacunas avirulentas vivas, aunque requería la inmunización repetida y se determina la protección frente a provocaciones heterólogas (18, 38). La exposición de cerdos jóvenes con cepas virulentas vivas mostró un efecto positivo de reducción de los signos clínicos característicos de la infección por *S. suis*, aunque no el signo nervioso central ni la mortalidad (35). Debido a que la cápsula de *S. suis* desempeña un papel importante en la virulencia, se han realizado intentos para desarrollar una vacuna basada en el material capsular. Sin embargo, esta vacunación no ha resultado satisfactoria debido a que el polisacárido capsular es poco inmunogénico (7). Más recientemente, el interés se ha desplazado hacia los antígenos proteicos de *S. suis* como candidatos para vacunas. Se ha demostrado que las vacunas de subunidades que utilizan suilisina (20) o PLR (proteína liberada por la muramidasa) y FE (factor de proteínas extracelulares) (39) protegen a los cerdos frente a las cepas de serotipo 2 homólogas y heterólogas, aunque su utilización resulta dificultada por el hecho de que un número sustancial de cepas virulentas en algunas regiones geográficas no expresan estas proteínas (8, 12, 29). Se ha identificado un gen codificante de una proteína de *Streptococcus suis* de 38 kDa. Esta proteína sería capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora en cerdos (45). De esta manera, la identificación de otros factores antigénicos, especialmente proteínas de superficie, podría contribuir al desarrollo de una vacuna de subunidades.

De esta manera, existe una necesidad de encontrar y utilizar nuevas dianas para la prevención, el tratamiento y el diagnóstico de las enfermedades asociadas a *S. suis* y las infecciones causadas por *S. suis*.

Sumario de la invención

Un objetivo de la invención es satisfacer la necesidad anteriormente indicada. Más específicamente, el objetivo se consigue proporcionando una SP1 aislada que puede inducir una respuesta inmunitaria de *Streptococcus suis* específica, que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 95% respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 4 o nº 17.

Otro objeto de la invención se refiere además a un polinucleótido de SP1 aislado codificante de un polipéptido tal como se ha definido anteriormente.

La presente invención se refiere además a un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido SP1 de la invención que consiste en la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 4 o en SEC ID nº 17.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar un vector que comprende el polinucleótido tal como se ha definido anteriormente.

Todavía otro objetivo de la invención es proporcionar una composición para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a *Streptococcus suis* o una infección causada por *S. suis*, que comprende un vehículo aceptable y por lo menos uno de los elementos siguientes:

- un polipéptido tal como se ha definido anteriormente,

- un polipéptido tal como se ha definido anteriormente,
- un vector tal como se ha definido anteriormente.

5 Otro objetivo de la invención es proporcionar una composición que comprende un vehículo aceptable y por lo menos un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente.

10 Un objeto adicional de la invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición tal como se ha definido anteriormente para la prevención de enfermedades asociadas a *Streptococcus suis* o una infección causada por *S. suis*, que comprende la etapa de mezclar por lo menos un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente con por lo menos un vehículo aceptable, en el que el anticuerpo o anticuerpos resultan de una vacunación con un adyuvante que dirige a Th-1.

15 Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento para preparar una composición para la utilización en la prevención de una enfermedad o infección asociada a *Streptococcus suis* en un animal, que comprende las etapas de mezclar por lo menos uno de entre:

- un polipéptido tal como se ha definido anteriormente,
- 20 - un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente,
- un vector tal como se ha definido anteriormente,

25 con por lo menos un vehículo aceptable y un adyuvante que dirige a Th1.

Un objeto adicional de la invención es un polipéptido tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, un vector de expresión tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, o una composición tal como se ha

30 Otro objeto de la invención se refiere a un polipéptido tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, un vector de expresión tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, o una composición tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, para la utilización en la prevención de una enfermedad o

35 Un objeto adicional se refiere a un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente o una composición tal como se ha definido anteriormente para la utilización como medicamento, en el que por lo menos un anticuerpo resulta de una vacunación con un adyuvante que dirige a Th1.

40 Otro objeto se refiere a un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente o una composición tal como se ha definido anteriormente para la utilización en la prevención de una enfermedad o infección asociada a *Streptococcus suis* en un medicamento de animal en el que el anticuerpo o anticuerpos resultan de la vacunación con un adyuvante que dirige a Th1.

45 Un objeto adicional se refiere a un procedimiento para detectar *in vitro* la presencia o la ausencia de una cepa de *Streptococcus suis* en una muestra, que comprende las etapas de:

- 50 a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo de la invención durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario, y
- b) detectar la presencia o la ausencia del complejo inmunitario formado en a).

55 Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento para detectar *in vitro* la presencia o la ausencia de anticuerpos cultivados contra una cepa de *Streptococcus suis* en una muestra, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto la muestra con un polipéptido de la invención durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario, y
- 60 b) detectar la presencia o la ausencia del complejo inmunitario formado en a).

La presente invención proporciona además en otro objetivo un kit diagnóstico para la detección de la presencia o la ausencia de anticuerpos indicativos de cepa de *Streptococcus suis*, que comprende:

- 65 - un polipéptido según la invención,

- un reactivo para detectar un complejo inmunitario de polipéptido-anticuerpo,
- una muestra de referencia biológica que no presenta anticuerpos que se unan inmunitariamente a dicho polipéptido, y
- una muestra de comparación que comprende anticuerpos que pueden unirse específicamente a dicho polipéptido,

5

10

en el que dicho polipéptido, reactivo, muestra de referencia biológica y muestra de comparación se encuentran presentes en una cantidad suficiente para llevar a cabo dicha detección.

Todavía otro objetivo es proporcionar un kit diagnóstico para la detección de la presencia o la ausencia de polipéptidos indicativos de cepa de *Streptococcus suis*, que comprende:

15

- un anticuerpo de la invención,
- un reactivo para detectar un complejo inmunitario de polipéptido-anticuerpo,
- polipéptidos de una muestra de referencia biológica que se unen inmunitariamente a dicho anticuerpo, y
- una muestra de comparación que comprende polipéptidos que pueden unirse específicamente a dicho polipéptido,

20

25

en el que dicho anticuerpo, reactivo, muestra de referencia biológica y muestra de comparación se encuentran presentes en una cantidad suficiente para llevar a cabo dicha detección.

También se describen en la presente memoria un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia indicada en SEC ID nº 11 o derivado funcional de la misma, y un polinucleótido aislado codificante de dicho polipéptido, y utilización del mismo en una composición y/o procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o infección asociada a *Streptococcus suis* en un animal.

30

Breve descripción de las figuras

35

A menos que se indique específicamente lo contrario, los términos "SP1" y "Sao" se utilizan de manera intercambiable.

40

Figura 1: representación esquemática y mapa de restricción parcial de un polinucleótido preferente de la invención, es decir, la inserción de ADN del plásmido recombinante pSS735. Los números indican la distancia (en pares de bases) desde el extremo 5'.

45

Figura 2: secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 18) y secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID nº 17) del gen codificante de un polipéptido preferido de una primera forma de realización de la invención, es decir la proteína SP1 (o Sao) de *S. suis*. La secuencia de Shine-Dalgarno se encuentra en cursiva y subrayada. El codón de inicio, ATG, y el codón de parada, TAA, se muestran en negrita. Los dos segmentos hidrófobos en los extremos N-terminal y C-terminal de SP1 se encuentran subrayados. La flecha vertical indica el sitio de corte de una potencial peptidasa de señal. R1 a R10 indican el inicio de las unidades repetitivas. La región potencial asociada a la pared celular se encuentra subrayada con una línea discontinua. El motivo de anclaje membranal LPVTG se muestra dentro de una caja y se señala la cola C-terminal cargada.

50

Figura 3: alineación de la secuencia de aminoácidos de la región Lys³¹⁹ a Val⁶⁰¹ de SP1 con el factor de avirulencia AvrXa7 de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Las líneas verticales indican las posiciones con residuos idénticos. Los dobles puntos representan las sustituciones conservadas y los puntos individuales representan las sustituciones funcionales.

55

Figura 4: expresión de la proteína de fusión MBP-SP1 en *E. coli* XL1-Blue y purificación de la SP1 madura recombinante. El gel teñido con Coomassie (A) y el análisis de transferencia western (B) de las muestras correspondientes sondeadas con suero de cerdo convaleciente mostraron el lisado de células completas de *E. coli* antes (carril 1) y después (carril 2) de la inducción con IPTG, extracto de citoplasma (carril 3), proteína de fusión MBP-SP1 purificado por afinidad (carril 4), SP1 y MBP cortado por factor X (carril 5) y SP1 recombinante sin MBP purificado utilizando cromatografía de intercambio iónico (carril 6). Las masas moleculares de las proteínas estándares se indican a la izquierda.

60

65

Figura 5: microscopía inmunoelectrónica de *S. suis* (4.500 x). Se muestra la localización en superficie de SP1 sobre *S. suis* utilizando un antisuero de SP1 mono específico y un anticuerpo secundario conjugado con oro (B). No se observó marcaje en las células bacterianas de control (A). Barras: 200 nm.

- 5
 Figura 6: respuestas de anticuerpos tras la vacunación con SP1 en lechones. (A) La IgG total específica de SP1 se midió mediante ELISA, mostrando que una única inyección de SP1 inducía una respuesta de IgG significativa que resultó incrementada evidentemente por el refuerzo. (B) El ELISA para isotipos séricos de IgG en cerdos inmunizados con SP1 demostró que los niveles de IgG1 eran consistentemente más elevados que los niveles de IgG2. Los resultados se expresan como medias de absorbancia y errores estándares. *: $p \leq 0,05$.
- 10
 Figura 7: títulos de IgG humorales totales específicos de SP1 en ratones inmunizados con Quil A y Quil A más SP1.
- 15
 Figura 8: subclases de IgG en sueros de ratones inmunizados con SP1 recombinante.
- Figura 9: la vacunación con SP1 recombinante protege a los ratones frente a la infección por *S. suis*.
- Figura 10: la vacunación con SP1 recombinante protege a los ratones frente a la muerte por *S. suis*.
- 20
 Figura 11: secuencia de nucleótidos de un fragmento polinucleótido funcional, es decir, el fragmento del gen SP1A y las secuencias deducidas de aminoácidos. SP1A reaccionó fuertemente con un suero de cerdo convaleciente en filtros de inmunotransferencia y la inmunización con SP1A recombinante indujo respuestas humorales de anticuerpos significativas en cerdos y ratones, demostrando que SP1A es altamente inmunogénico (ver el ejemplo 5).
- 25
 Figura 12: representación esquemática y mapa de restricción parcial de la inserción de 6,3 kb de fago recombinante. Los números indican la distancia (en pares de bases) desde el extremo 5'.
- 30
 Figura 13: secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del gen codificante de la proteína SP1 de *S. suis*. La agrupación de cargas positivas en el extremo N-terminal de SP2 se encuentra subrayada. La secuencia de señal N-terminal potencial se encuentra subrayada con una línea discontinua. El dominio LysM se muestra dentro de una caja y las flechas indican el inicio de las unidades repetitivas.
- 35
 Figura 14: distribución del gen SP2 en diferentes serotipos de *S. suis*. Los genes SP2 se amplificaron mediante PCR de 31 de las 33 cepas de referencia de serotipo de *S. suis*.
- 40
 Figura 15: expresión de la proteína de fusión Trx-His-SP2 en *E. coli* y purificación de la SP2 madura recombinante. El gel teñido con Coomassie muestra el lisado de células completas de *E. coli* tras la inducción con IPTG, la proteína de fusión Trx-His-SP2 purificada por afinidad, SP2 y Trx-His cortados con enteroquinasa, SP2 madura y Trx-etiqueta His separadas mediante una cromatografía de intercambio aniónico. Se indican las masas moleculares a la izquierda.
- 45
 Figura 16: actividad inmunogénica y de unión a IgG de SP2 recombinante. a) El suero de conejo específico de SP2 reacciona con la preparación celular de *S. suis* S735. b) La SP2 recombinante reacciona con el suero de cerdo convaleciente. La SP2 recombinante se une a IgG humana (c) y porcina (d).
- 50
 Figura 17: respuesta de anticuerpos tras la vacunación con SP2 recombinante en ratones. Se midió la IgG específica de SP2 en los sueros mediante ELISA.
- Figura 18: la vacunación con SP2 recombinante alivia los signos clínicos de los ratones retados con una cepa virulenta de *S. suis*.
- Figura 19: la vacunación con SP2 recombinante protege a los ratones frente a la muerte por *S. suis*.
- 55
 Figura 20: temperatura corporal de cerdos vacunados con la composición según una forma de realización preferida de la invención, tras la provocación.
- Figura 21: enfermedad clínica de cerdos vacunados con la composición según una forma de realización preferida de la invención, tras la provocación.
- 60
 Figura 22: supervivencia de cerdos vacunados con la composición según una forma de realización preferida de la invención, tras la provocación.
- Figura 23: títulos de IgG totales séricos de cerdos vacunados con la composición según una forma de realización preferida de la invención.
- 65
 Figura 24: subclases de IgG inducidas en cerdos vacunados con la composición según una forma de realización preferida de la invención.
- Figura 25: alineación de secuencias de aminoácidos de dos polipéptidos SP1, SEC ID nº 1 y nº 2.

Figura 26: alineación de secuencias de aminoácidos de dos polipéptidos SP1: SEC ID nº 1 y nº 3.

Figura 27: alineación de secuencias de aminoácidos de dos polipéptidos SP1 según formas de realización preferidas de la invención: SEC ID nº 2 y nº 3.

Figura 28: alineación de secuencias de aminoácidos de tres polipéptidos SP1: SEC ID nº 1, nº 2 y nº 3.

Breve descripción de la invención

En el contexto de la presente invención se ha descubierto inesperadamente que dos nuevos polipéptidos de *S. suis* y polinucleótidos codificantes de los mismos participan en el mecanismo patógeno de *S. suis*. En este aspecto, la presente descripción se refiere específicamente a la identificación de los mismos y a la utilización de dichos polipéptidos o polinucleótidos en composiciones y procedimientos destinados a la prevención, tratamiento y diagnóstico de las enfermedades asociadas a *Streptococcus suis* o la infección causada por *S. suis*.

Una lista no limitativa de enfermedades asociadas a *Streptococcus suis* para las que pueden resultar útiles los procedimientos de la invención incluye enfermedades tales como la artritis, la endocarditis, la meningitis, la neumonía y la septicemia.

Definiciones

El término "aislado" pretende referirse a un polinucleótido, un polipéptido o un anticuerpo que se encuentra en un medio diferente de aquel en el que el polinucleótido, el polipéptido, el anticuerpo o la célula hospedadora se encuentra de manera natural.

El término "animal" se refiere a cualquier animal susceptible de ser infectado por una cepa de *Streptococcus*, tal como *S. suis*. Específicamente, dicho animal puede ser, aunque sin limitación, ratones, cerdos, ovejas, caballos y seres humanos. Más específicamente, el animal consiste en un cerdo.

El término "tratar" se refiere a un procedimiento por el que los síntomas de una infección o de una enfermedad asociada a una cepa de *Streptococcus* se alivian o se eliminan por completo. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "prevenir" se refiere a un procedimiento por el que los síntomas de una infección o de una enfermedad asociada a una cepa de *Streptococcus* se bloquean o se retrasan.

La expresión "respuesta protectora" se refiere a la prevención de la aparición de una enfermedad asociada a *Streptococcus suis* o de una infección causada por *S. suis*, o a la reducción de la gravedad de dicha enfermedad presente en un animal. El nivel de "respuesta protectora" puede evaluarse, por ejemplo, asignando puntuaciones clínicas tales como las definidas en el ejemplo 4.

La expresión "un vehículo aceptable" se refiere a un vehículo para contener los compuestos obtenidos mediante el procedimiento de la invención que pueden administrarse en un huésped animal sin efectos adversos. Entre los vehículos adecuados conocidos en la técnica se incluyen, aunque sin limitación, partículas de oro, agua estéril, solución salina, glucosa, dextrosa o soluciones tamponadas. Entre los vehículos pueden incluirse agentes auxiliares, incluyendo, aunque sin limitación, diluyentes, estabilizadores (es decir, azúcares y aminoácidos), conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes tamponadores del pH, aditivos potenciadores de la viscosidad, colorantes y similares.

El término "fragmento", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia polinucleotídica (por ejemplo ADNc) que es una parte aislada del ácido nucleico de la invención construido artificialmente (por ejemplo mediante síntesis química) o mediante el corte de un producto natural en múltiples trozos, utilizando endonucleasas de restricción o la fragmentación mecánica, o una parte de un ácido nucleico sintetizado mediante PCR, ADN polimerasa o cualquier otra técnica de polimerización bien conocida en la técnica, o expresarse en una célula hospedadora mediante tecnología de ácidos nucleicos recombinantes bien conocidos por el experto en la materia.

1. Polinucleótidos y polipéptidos

La presente memoria describe un polipéptido aislado que consiste en una proteína de superficie, y más particularmente una proteína de superficie anclada por el extremo C-terminal procedente de *Streptococcus suis* denominada SP1 o Sao. Tal como se muestra en la sección de ejemplos, el polipéptido SP1 ventajosamente induce una respuesta protectora frente a una provocación de una cepa de *Streptococcus suis* al administrarlo en un animal, tal como un cerdo.

Específicamente, el polipéptido aislado comprende por lo menos 15, o todavía más preferentemente por lo menos 25 o todavía más preferentemente por lo menos 35 aminoácidos contiguos en la región N-terminal de la secuencia de aminoácidos indicada en SEC ID nº 1. Tal como podría apreciar el experto en la materia, la expresión "región

N-terminal" en referencia a la proteína Sao preferentemente consiste en la región que comprende los residuos aminoácidos 1 a 293 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 1.

5 El polipéptido aislado descrito en la presente memoria puede comprender además por lo menos una secuencia de aminoácidos repetitiva tal como la mostrada en la figura 2. Más particularmente, una secuencia de aminoácidos repetitiva puede consistir de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº 9, en la que:

- 10 - Xaa₁ es Val, Thr o Ile,
- Xaa₃ es Lys o Glu,
- Xaa₄ es Lys o Glu,
- 15 - Xaa₅ es Ala o Gln,
- Xaa₇ es Thr o Pro,
- 20 - Xaa₈ es Gly, Ser o Val,
- Xaa₉ es Lys, Val, Ile o Asn,
- Xaa₁₀ es Glu o Val,
- 25 - Xaa₁₁ es Lys o Asn,
- Xaa₁₂ es Gly, Glu o Asp,
- 30 - Xaa₁₃ es Asn o Met,
- Xaa₁₄ es Ile, Ala o Val,
- Xaa₁₅ es Glu o Val,
- 35 - Xaa₁₆ es Pro o Thr,
- Xaa₁₈ es Glu o Gln,
- Xaa₁₉ es Lys o Glu,
- 40 - Xaa₂₂ es Thr o Ala,
- Xaa₂₆ es Lys o Asn,
- 45 - Xaa₂₇ es Asp o Glu,
- Xaa₂₈ es Asn o Lys,
- 50 - Xaa₂₉ es Ile o Val, y
- Xaa₃₀ es Glu o Val.

55 Debe apreciarse que dicho polipéptido SP1 puede comprender únicamente una de dichas secuencias repetitivas, mientras que en algunos otros casos, dicho polipéptido SP1 puede comprender por lo menos dos secuencias repetitivas o incluso más de diez de dichas secuencias repetitivas.

60 Por ejemplo, el polipéptido SP1 aislado comprende por lo menos 15 o todavía más preferentemente 25 o todavía más preferentemente 35 aminoácidos contiguos en la región C-terminal de la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 1. Preferentemente, la región C-terminal comprende un motivo de anclaje a membrana, tal como la que consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 10, es decir, Leu Pro Val Thr Gly.

65 Tal como apreciará el experto en la materia, la expresión "región C-terminal" en el contexto de la presente memoria en referencia a la proteína SP1, preferentemente consiste en la región comprendida entre los residuos aminoácidos 593 a 670 de la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 1.

Por ejemplo, un polipéptido SP1 comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEC ID nº 1 a nº 3 o derivado funcional del mismo. Un polipéptido SP1 de la invención puede consistir en una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en SEC ID nº 1 o un derivado funcional del mismo.

5 Un "derivado funcional" tal como se entiende de manera general y se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de proteína/péptido que presenta una actividad biológica funcional que es sustancialmente similar a la actividad biológica de la secuencia de proteína/péptido completa. En otras palabras, preferentemente se refiere a un polipéptido o fragmento o fragmentos del mismo que retienen sustancialmente la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria, tal como una respuesta protectora frente a una provocación de una cepa de *S. suis* al administrar dicho derivado funcional en un animal.

La presente invención se refiere a:

- 15 - un polipéptido SP1 aislado que puede inducir una respuesta inmunitaria específica de *Streptococcus suis* que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 95% respecto a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 4 o nº 17.
- 20 - El polipéptido SP1 aislado tal como se ha definido anteriormente, que comprende la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 10.
- El polipéptido SP1 aislado tal como se ha definido anteriormente, que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 95% respecto a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 17.
- 25 - El polipéptido SP1 aislado tal como se ha definido anteriormente, que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 95% respecto a la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 4.
- 30 - El polipéptido SP1 aislado según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 17.
- El polipéptido SP1 aislado tal como se ha definido anteriormente, que comprende la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 4.
- 35 - Un polipéptido SP1 aislado que puede inducir una respuesta inmunitaria específica de *Streptococcus suis*, que comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 2 o nº 3.
- El polipéptido SP1 aislado tal como se ha definido anteriormente, que consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 17.
- 40 - El polipéptido SP1 aislado tal como se ha definido anteriormente, que consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 4.
- 45 - El polipéptido SP1 aislado tal como se ha definido anteriormente, en el que induce una respuesta protectora frente a una provocación de una cepa de *Streptococcus suis* al administrarlo en un animal.

Se describe además otro polipéptido de *S. suis* aislado, denominado SP2, que induce ventajosamente una respuesta protectora en un animal.

50 Específicamente, dicho polipéptido SP2 aislado comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a una secuencia proporcionada en SEC ID nº 11 o derivado funcional del mismo.

55 La expresión "sustancialmente idéntico" en referencia a una secuencia de aminoácido se entiende que se refiere a que el polipéptido preferentemente presenta una secuencia de aminoácidos que presenta una homología de por lo menos 75%, o todavía más preferentemente una homología de 85%, o todavía más preferentemente una homología de 95% respecto a parte o la totalidad de las secuencias mostradas en SEC ID nº 11.

60 El término "homología" en el presente contexto se refiere a que es idéntica o similar a la secuencia a la que se hace referencia mientras que las sustituciones/modificaciones sencillas de cualquiera de los aminoácidos proporcionados se encuentran incluidas también. Una búsqueda de homología a este respecto puede llevarse a cabo con BLAST-P (Basic Local Alignment Search Tool [herramienta de búsqueda de alineación local básica]), un programa bien conocido por el experto en la materia. Para la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente, la homología se refiere a los programas BLASTX y BLASTN conocidos en la técnica.

65 Se describe además un polinucleótido aislado codificante de un polipéptido SP1 o SP2. Dicho polinucleótido aislado

comprende una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a la secuencia mostrada en SEC ID nº 18, nº 6 y nº 7 en referencia a SP1 y SEC ID nº 12 en referencia a SP2 y los fragmentos funcionales respectivos de los mismos.

5 La expresión "sustancialmente idéntica" en referencia a una secuencia de ácidos nucleicos se entiende que se refiere a que el polinucleótido de la invención preferentemente presenta una secuencia de ácidos nucleicos que es por lo menos 65% idéntica, más particularmente 80% idéntica y todavía más particularmente 95% idéntica a parte o toda la secuencia mostrada en SEC ID nº 18, nº 6 y nº 7 y nº 12 o fragmentos funcionales de los mismos.

10 Un "fragmento funcional", tal como se entiende de manera general y se utiliza en la presente memoria, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una actividad biológica funcional que es sustancialmente similar a la actividad biológica de la secuencia de ácidos nucleicos completa. En otras palabras, y en el contexto de la presente invención, preferentemente se refiere a un ácido nucleico o uno o más fragmentos que conservan sustancialmente la capacidad de codificar un polipéptido/proteína que induce una respuesta inmunitaria, y más preferentemente una
15 respuesta protectora, contra una provocación de una cepa de *Streptococcus suis* al administrarlo en un animal. Por ejemplo, dicho fragmento es el polinucleótido mostrado en SEC ID nº 8, que codifica el polipéptido SP1A tal como se ha definido anteriormente.

Los polinucleótidos SP1 aislados según la presente invención son:

- 20
- el polinucleótido de SP1 aislado codificante de un polipéptido tal como se ha definido anteriormente,
 - el polinucleótido de SP1 aislado tal como se ha indicado anteriormente, en el que la secuencia polinucleotídica presenta una identidad de 95% respecto a la secuencia proporcionada en SEC ID nº 18,

25

 - el polinucleótido de SP1 aislado tal como se ha indicado anteriormente, en el que la secuencia polinucleotídica presenta una identidad de 95% respecto a la secuencia proporcionada en SEC ID nº 8,
 - el polinucleótido de SP1 aislado tal como se ha indicado anteriormente, que comprende la secuencia proporcionada en SEC ID nº 18,

30

 - el polinucleótido de SP1 aislado según la reivindicación 11, que comprende la secuencia polinucleotídica proporcionada en SEC ID nº 8.

35 En otra forma de realización, la invención se refiere además a un vector (por ejemplo un vector de clonación o de expresión) que comprende el polinucleótido de SP1 aislado de la invención tal como se ha definido anteriormente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a un constructo de polinucleótido diseñado para la transducción/transfección de uno o más tipos celulares. Los vectores pueden ser, por ejemplo, "vectores de clonación" que están diseñados para el aislamiento, la propagación y la replicación de los nucleótidos insertados; "vectores de expresión", los cuales están diseñados para la expresión de una secuencia de nucleótidos en una célula huésped, o un "vector vírico", que está diseñado para resultar en la producción de un virus recombinante o una partícula de tipo vírico, o "vectores lanzadera", que comprenden los atributos de más de un tipo de vector.

45 Se encuentran disponibles varios vectores adecuados para la transfección estable de células y bacterias (por ejemplo plásmidos, adenovirus, baculovirus, baculovirus de levaduras, virus vegetales, virus adenoasociados, retrovirus, virus del herpes simplex, alfavirus, lentivirus), al igual que los procedimientos para construir dichas líneas celulares. Debe apreciarse que la presente invención comprende cualquier tipo de vector que comprende cualquiera de las moléculas polinucleotídicas de la invención.

50 2. Anticuerpos

En otra forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido SP1 que consiste en la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEC ID nº 4 o en SEC ID nº 17. Más
55 específicamente, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o monoclonal purificado que se une específicamente a los polipéptidos SP1 tal como se ha definido anteriormente.

Los anticuerpos de la invención pueden prepararse mediante una diversidad de procedimientos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden administrarse en un animal con el fin de inducir la producción de anticuerpos policlonales. Alternativamente, y tal como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos utilizados tal como se indica en la presente memoria pueden ser anticuerpos monoclonales, los cuales se preparan utilizando tecnologías de hibridoma conocidas (ver, por ejemplo, Hammerling et al., en: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, NY, 1981; Charland N., M. Jacques, S. Lacouture y M. Gottschalk, Characterization and protective activity of a monoclonal antibody against a capsular epitope shared by *Streptococcus suis* serotypes 1, 2 y 1/2, Microbiology 143 (parte 11):3607-14, 1997).

Con respecto a los anticuerpos de la presente invención, la expresión "se une específicamente a" se refiere a anticuerpos que se unen con una afinidad relativamente elevada de uno o más epítomos del polipéptido SP1 de la invención, pero que no reconocen sustancialmente y se unen a moléculas diferentes de los polipéptidos SP1 de la invención. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "afinidad relativamente elevada" se refiere a una afinidad de unión entre el anticuerpo y los polipéptidos SP1 de por lo menos 10^6 M^{-1} , y preferentemente de por lo menos aproximadamente 10^7 M^{-1} y todavía más preferentemente de entre 10^8 M^{-1} y 10^{10} M^{-1} . La determinación de dicha afinidad preferentemente se lleva a cabo bajo unas condiciones de inmunoensayo de unión competitiva estándar que son conocimientos comunes que posee el experto en la materia.

3. Procedimientos de tratamiento y composiciones

Los polipéptidos SP1, polinucleótidos codificantes de los mismos y anticuerpos de la invención pueden utilizarse de muchas maneras en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades asociadas a *Streptococcus suis* o la infección causada por *S. suis*.

Por ejemplo, y según un aspecto de la invención, los polipéptidos SP1 de la invención pueden utilizarse como inmunógenos para la producción de anticuerpos específicos para el tratamiento y/o la prevención de la infección por *Streptococcus suis*. Los anticuerpos adecuados pueden determinarse utilizando métodos de cribado apropiados, por ejemplo mediante la medición de la capacidad de un anticuerpo particular de protección pasiva frente a la infección por *Streptococcus suis* en un modelo de ensayo. Son ejemplos de un modelo animal, los modelos de ratón y de cerdo indicados en los ejemplos en la presente memoria.

Según otro aspecto, los polinucleótidos codificantes de polipéptidos de la invención o derivados de los mismos pueden utilizarse en un procedimiento de inmunización con ADN. Es decir, pueden incorporarse en un vector que es replicable y expresable tras la inyección, produciendo de esta manera el polipéptido antigénico *in vivo*. Por ejemplo, pueden incorporarse polinucleótidos en un vector plásmido bajo el control del promotor del CMV, que es funcional en las células eucarióticas. Preferentemente, el vector se inyecta por vía intramuscular.

La utilización de un polinucleótido de la invención en la inmunización genética preferentemente utilizará un procedimiento o sistema de administración adecuado, tal como la inyección directa de ADN plasmídico en los músculos [Wolf et al., H.M.G. 1:363, 1992; Turnes et al., Vaccine 17:2089, 1999; Le et al., Vaccine 18:1893, 2000; Alves et al., Vaccine 19:788, 2001], la inyección de ADN plasmídico con o sin adyuvantes [Ulmer et al., Vaccine 18:18, 1999; MacLaughlin et al., J. Control Release 56:259, 1998; Hartikka et al., Gene Ther. 7:1171-82, 2000; Benvenisty y Reshef, PNAS USA 83:9551, 1986; Singh et al., PNAS USA 97:811, 2000], acción dirigida sobre células mediante la administración de ADN acompañado con vehículos específicos [Wa et al., J. Biol. Chem. 264:16985, 1989; Chaplin et al., Infect. Immun. 67:6434, 1999], la inyección de plásmido acompañado o encapsulado en diversas formas de liposoma [Ishii et al., AIDS Research and Human Retroviruses 13:142, 1997; Perrie et al., Vaccine 19:3301, 2001], la administración de ADN con diferentes métodos de bombardeo [Tang et al., Nature 356:152, 1992; Eisenbraun et al., ADN Cell Biol. 12:791, 1993; Chen et al., Vaccine 19:2908, 2001], y la administración de ADN con vectores vivos [Tubulekas et al., Gene 190:191, 1997; Pushko et al., Virology 239:389, 1997; Spreng et al., FEMS 27:299, 2000; Dietrich et al., Vaccine 19:2506, 2001].

Un aspecto adicional de la invención es la utilización de los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la invención para la inmunización pasiva. Podrían utilizarse los anticuerpos descritos en la presente solicitud.

A este respecto, otra forma de realización de la presente invención se refiere a una composición para prevenir o tratar dichas enfermedades o infecciones.

Las composiciones según la invención son:

- una composición que comprende un vehículo aceptable y por lo menos uno de entre:
- un polipéptido tal como se ha definido anteriormente,
- un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente, o
- un vector tal como se ha definido anteriormente.
- una composición que comprende un vehículo aceptable y por lo menos un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente.

En una forma de realización preferida, la composición de la invención comprende además un adyuvante. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "adyuvante" se refiere a una sustancia añadida a la composición de la invención para incrementar la inmunogenicidad de la composición. No se conoce por completo cuál es el mecanismo por el que funciona un adyuvante. Se cree que algunos adyuvantes incrementan la respuesta inmunitaria (respuesta humoral y/o celular) liberando lentamente el antígeno, mientras que otros adyuvantes son fuertemente

inmunogénicos por sí mismos y se cree que actúan sinérgicamente. Entre los adyuvantes conocidos se incluyen, aunque sin limitación, emulsiones de aceite y agua (por ejemplo, adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund), *Corynebacterium parvum*, Quil A, citocinas tales como IL12, Emulsigen-Plus®, Bacillus Calmette Guerin, hidróxido de aluminio, glucano, dextran sulfato, óxido de hierro, alginato sódico, adyuvante Bacto, determinados polímeros sintéticos, tales como poli-aminoácidos y copolímeros de aminoácidos, saponina, aceite de parafina y dipéptido muramilo. Los adyuvantes comprenden además adyuvantes genéticos, tales como moléculas inmunomoduladoras codificadas en un ADN coinoculado o como oligonucleótidos de CpG. El ADN coinoculado puede encontrarse en el mismo constructo plásmido que el inmunógeno plásmido o en un vector de ADN separado.

10 La presente invención se refiere además a:

- 5 - un procedimiento para preparar una composición tal como se ha definido anteriormente para prevenir enfermedades asociadas a *Streptococcus suis* o una infección causada por *S. suis*, que comprende la etapa de mezclar por lo menos un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente con por lo menos un vehículo aceptable, en el que el anticuerpo o anticuerpos resultan de una vacunación con un adyuvante que dirige a Th1.
- 15 - Un procedimiento para preparar una composición para la utilización en la prevención de una enfermedad o infección asociada a *Streptococcus suis* en un animal, comprendiendo el procedimiento la etapa de mezclar por lo menos uno de entre:
 - 20 - un polipéptido tal como se ha definido anteriormente,
 - un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente,
 - 25 - un vector tal como se ha definido anteriormente,

con por lo menos un vehículo aceptable y un adyuvante que dirige a Th1.

- 30 - Un polipéptido tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1; un vector de expresión tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, o una composición tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, para la utilización como medicamento o como vacuna.
- 35 - Un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, un polinucleótido tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, un vector de expresión tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, o una composición tal como se ha definido anteriormente y un adyuvante que dirige a Th1, para la utilización en la prevención de una enfermedad o infección asociada a *Streptococcus suis* en un animal.
- 40 - Un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente o una composición tal como se ha definido anteriormente para la utilización como medicamento, en el que el anticuerpo o anticuerpos resultan de una vacunación con un adyuvante que dirige a Th1.
- 45 - Un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente o una composición tal como se ha definido anteriormente para la utilización en la prevención de una enfermedad o infección asociada a *Streptococcus suis* en un medicamento animal en el que por lo menos un anticuerpo resulta de una vacunación con un adyuvante que dirige a Th1.

50 Sin embargo, una forma de realización adicional de la presente invención es proporcionar la utilización de la invención, comprendiendo la etapa de administrar en el animal una composición según la invención.

Pueden añadirse agentes adicionales a la composición de la invención. Por ejemplo, la composición de la invención puede comprender además agentes tales como fármacos, inmunoestimuladores (tales como interferón- α , interferón- β , interferón- γ , factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (FEC-GM), factor estimulante de colonias de macrófagos (FEC-M) e interleuquina-2 (IL2)), antioxidantes, surfactantes, agentes saborizantes, aceites volátiles, agentes tamponadores, dispersantes, propelentes y conservantes. Para la preparación de dichas composiciones, pueden utilizarse procedimientos bien conocidos de la técnica.

60 La cantidad de los componentes o los elementos de la composición de la invención preferentemente es una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz del componente contemplado es la cantidad necesaria para permitir que el mismo realice su función inmunitaria sin provocar excesivos efectos negativos en el huésped en el que se administra la composición. La cantidad exacta de los componentes que deben utilizarse y de la composición que debe administrarse variará según factores tales como el tipo de afección bajo tratamiento, el tipo y edad del animal bajo tratamiento, el modo de administración, así como los demás ingredientes en la composición.

La composición de la invención puede administrarse en un animal mediante diversas vías de administración. Por ejemplo, la composición puede administrarse en forma de preparaciones inyectables estériles, tales como suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles. Estas suspensiones pueden formularse según técnicas conocidas en la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes y de suspensión adecuados. Las preparaciones inyectables estériles también pueden ser soluciones o suspensiones inyectables estériles en diluyentes o solventes parenteralmente aceptables no tóxicos. Pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo intravenosa, intramuscular o subcutánea mediante inyección, infusión o por boca. Las dosis adecuadas pueden variar según factores tales como la cantidad de cada uno de los componentes en la composición, el efecto deseado (a corto plazo o a largo plazo), la vía de administración, la edad y el peso del animal que debe tratarse. Cualesquiera otros procedimientos bien conocidos en la técnica pueden utilizarse para administrar la composición de la invención.

4. Procedimientos de detección o diagnóstico y kits

Los polipéptidos SP1 y/o SP2, los polinucleótidos codificantes de los mismos y los anticuerpos de la invención también pueden utilizarse de diferentes maneras en la detección y diagnóstico de las enfermedades asociadas a *Streptococcus suis* o las infecciones causadas por *S. suis*.

En este aspecto y en una forma de realización adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar *in vitro* la presencia o la ausencia de una cepa de *Streptococcus suis* en una muestra, que comprende las etapas siguientes:

- a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo de la invención tal como se ha definido anteriormente durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar un complejo, y
- b) detectar la presencia o la ausencia del complejo formado en a).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "muestra" se refiere a una diversidad de tipos de muestra obtenidos de un animal y puede utilizarse en un ensayo diagnóstico o de detección. La definición comprende muestras de sangre y de otros líquidos de origen biológico, muestras de tejido sólido, tales como un espécimen de biopsia o cultivo de tejido o células derivadas de los mismos.

Sin embargo, en otra forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento de detección *in vitro* de la presencia o la ausencia de anticuerpos cultivados contra una cepa de *Streptococcus suis* en una muestra, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto la muestra con un polipéptido de la invención tal como se ha definido anteriormente durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario, y
- b) detectar la presencia o la ausencia del complejo inmunitario formado en a).

El experto en la materia reconocerá que dicho ensayo diagnóstico puede adoptar varias formas, incluyendo un ensayo inmunológico, tal como un ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA) o un radioinmunoensayo, esencialmente para determinar si los anticuerpos específicos para la proteína (tales como SP1 y/o SP2) se encuentran presentes en un organismo.

La presente invención proporciona además kits para la utilización en cualquiera de los procedimientos diagnósticos anteriormente indicados. Dichos kits típicamente comprenden dos o más componentes necesarios para llevar a cabo un ensayo diagnóstico. Los componentes pueden ser compuestos, reactivos, recipientes y/o equipos. Por ejemplo, un recipiente dentro de un kit puede contener un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un polipéptido SP1 o SP2 de la invención. Uno o más recipientes adicionales pueden incluir elementos, tales como reactivos o tampones, para la utilización en el ensayo.

En este aspecto, la presente invención proporciona además un kit diagnóstico para la detección de la presencia o la ausencia de anticuerpos indicativos de cepa de *Streptococcus suis*, que comprende:

- un polipéptido SP1 aislado según la invención,
- un reactivo para detectar el complejo inmunitario de polipéptido-anticuerpo,
- una muestra de referencia biológica sin anticuerpos que se unen inmunitariamente a dicho péptido, y
- una muestra de comparación que comprende anticuerpos que pueden unirse específicamente a dicho polipéptido,

en el que dicho polipéptido, reactivo, muestras de referencia biológica, y muestra de comparación se encuentran presentes en una cantidad suficiente para llevar a cabo dicha detección.

Otro kit diagnóstico preferentemente contemplado es un kit para la detección de la presencia o la ausencia de polipéptidos indicativos de la cepa de *Streptococcus suis*, que comprende:

- 5 - un anticuerpo según la invención,
- un reactivo para detectar complejo inmunitario de polipéptido-anticuerpo,
- 10 - polipéptidos de una muestra de referencia biológica que se unen específicamente a dicho anticuerpo, y
- una muestra de comparación que comprende polipéptidos que pueden unirse específicamente a dicho polipéptido,

15 en el que dicho anticuerpo, reactivo, muestra de referencia biológica y muestra de comparación se encuentran presentes en una cantidad suficiente para llevar a cabo dicha detección.

Ejemplos

20 La presente invención se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los ejemplos siguientes. Los presentes ejemplos son ilustrativos de un amplio abanico de aplicabilidad de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la misma. Pueden llevarse a cabo modificaciones y variaciones en la misma sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Aunque pueden utilizarse cualesquiera procedimientos y materiales similares o equivalentes a los indicados en la presente memoria en la práctica para la puesta en práctica de la presente invención, a continuación en la presente memoria se describen procedimientos y materiales preferentes.

25

Ejemplo 1

Identificación de una proteína superficial de *Streptococcus suis* y evaluación de su capacidad inmunógena y protectora en cerdos

30

Se identificó una nueva proteína de superficie de *Streptococcus suis* con un suero de cerdos convalecientes infectados por *S. suis* de tipo 2. La proteína de 110 kDa aparentes denominada SP1 mostraba características típicas de las proteínas de superficie ancladas a membrana de las bacterias Gram-positivas, tales como una secuencia de señal y un motivo de anclaje a membrana LPVTG. Además, se ha detectado un dominio de avirulencia conservado que con frecuencia se encuentra en los patógenos vegetales. La microscopía electrónica utilizando un antisuero específico de SP1 confirmó la localización en superficie de la proteína SP1 sobre *S. suis*. El anticuerpo específico de SP1 reacciona con los lisados celulares de la mayoría de serotipos de *S. suis* y aislados de tipo 2 en filtros de inmunotransferencia, demostrando su elevada conservación en la especie *S. suis*. La inmunización de lechones con la SP1 recombinante por vía intramuscular indujo una respuesta de anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) total significativa. Sin embargo, la respuesta de anticuerpos no se reflejó en la protección de los cerdos retados por vía intratraqueal con una cepa virulenta en el modelo de vacunación convencional de los presentes inventores.

40

Materiales y métodos

45 Cepas bacterianas, fagos, plásmidos y medios. Se utilizó la cepa de referencia S735 de *S. suis* serotipo 2 para la construcción de la biblioteca genómica. En la tabla 1 se presentan cepas de referencia de los treinta y tres serotipos (tipos 1 a 31, 33 y 1/2), 26 cepas de campo de serotipo 2 de diferentes orígenes, así como cinco otros organismos Gram-positivos. El fago lambda Zap II y la cepa *Escherichia coli* XL1-Blue MRF se obtuvieron de un proveedor comercial (Stratagene, La Jolla, Calif.). Se cultivó *S. suis* en caldo de Todd-Hewitt (THB, Difco, Detroit, Mich.) o placas de agar (Quelab Laboratories, Montréal, Canadá) a 37°C con 5% de CO₂, mientras que otras bacterias Gram-positivas se cultivaron tal como se recomienda en el catálogo de la ATCC. Se cultivó *E. coli* en medio Luria-Bertani (LB) solo o en medio LB complementado con 2 g de maltosa/litro a 37°C. En caso apropiado, se cultivó *E. coli* en presencia de 50 µg de ampicilina/ml e isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,8 mM. Se utilizó el vector pMalTM-p (New England BioLabs) para generar la proteína de fusión MBP-SP1.

55

Antisueros. Se recolectaron sueros de cerdos convalecientes procedentes de cerdos infectados clínicamente por *S. suis* tipo 2 cepa S735. Se obtuvo suero anti-SP1 mono-específico mediante inmunización de conejos New Zealand White por vía intravenosa con 230 µg de SP1 purificado emulsionado con 0,5 ml de adyuvante incompleto de Freud. Los conejos recibieron dos inyecciones de refuerzo con la misma dosis de la SP1 a intervalos de 2 semanas y después se sangraron 10 días después de la última inmunización de refuerzo. Los sueros se almacenaron a -20°C hasta la utilización.

60

Identificación, clonación y secuenciación del gen *sp1*. Se aisló el ADN cromosómico de *S. suis* cepa S735 tal como se ha descrito anteriormente (33). El ADN cromosómico purificado se digirió parcialmente con el enzima de restricción EcoRI y los fragmentos resultantes se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos en el intervalo de tamaños de 6 a 10 kb se extrajeron del gel y se ligaron a los brazos de EcoRI del

65

vector λZAPII y el vector se encapsuló utilizando el extracto de empaquetamiento Gigapack II (Stratagene). Los fagos recombinantes se utilizaron para infectar *E. coli* XL1-Blue MRF', que a continuación se sembró en una placa con LB agar. Las placas resultantes se levantaron con membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canadá). Las membranas se bloquearon utilizando solución salina-Tris (TBS) con leche desnatada al 2% y se incubaron secuencialmente con el suero de cerdo convaleciente procedente de la infección con antisueros antiinmunoglobulina G (IgG) porcino de conejo conjugado con peroxidasa procedente de la infección por *S. suis* serotipo 2 (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, Pa.) y O-fenilén-diamina. Las placas positivas se purificaron hasta la homogeneidad. Se extrajeron los plásmidos pBluescript recombinantes con fago ayudante ExAssist (Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuencia de la inserción se determinó utilizando promotores de T3 y de T7 como cebadores en las instalaciones para la secuenciación de ADN de la University of Maine (Orono, ME, USA). Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas de los marcos abiertos de lectura (ORF) se analizaron utilizando programas disponibles en internet.

La secuencia codificante de la SP1 madura se amplificó a partir de ADN cromosómico purificado de la cepa S735 con los cebadores de PCR P1 (5'-ATGGATCCATTGAAGGCCGCTCGGCACAAGAAGTAAAA-3', SEC ID nº 13) y P2 (5'-CCAAGTCGACTTATAATTTACGTTTACGTGTA-3', SEC ID nº 14), que contenían los sitios de restricción BamHI y Sal I, respectivamente. Se llevó a cabo la PCR durante 5 min. a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 min. a 94°C, 30 s a 56°C, y 1 min. a 72°C. El fragmento de PCR resultante se clonó en los sitios Bam HI y Sal I del vector de expresión pMAL-p. El plásmido recombinante que contenía el gen *sp1* se denominó pORF3.

Expresión y purificación de proteína SP1 recombinante. El plásmido pORF3 purificado se utilizó para transformar la cepa XL1-Blue de *E. coli* mediante electroporación con el aparato Genepulse II (Bio-Rad) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Esta cepa recombinante se cultivó en medio LB más 2 g de glucosa/l y 50 µg de ampicilina/ml. Para la sobreexpresión, el cultivo se inoculó a partir de un cultivo de durante la noche con la DO₆₀₀ inicial del mismo ajustada a 0,1. El cultivo se incubó bajo agitación hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,8 y después se añadió IPTG con el fin de inducir la producción de la proteína de fusión MBP-SP1. Tras 2 horas de la inducción, se encontró la proteína de fusión en el periplasma bacteriano, además de en el citoplasma. Se decidió utilizar extractos de los lisados bacterianos para la purificación de la proteína SP1.

La proteína de fusión se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de amilosa (New England BioLabs) siguiendo las instrucciones del fabricante. El sedimento celular de *E. coli* se suspendió en el tampón de unión de la columna de afinidad (Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,4) y las células se lisaron utilizando la prensa celular francesa (SLM Instruments, Inc.). Tras la filtración a través de una membrana de 0,45 µm, el sobrenadante se sometió a la resina de amilosa. La proteína de fusión MBP-SP1 se eluyó con maltosa al 1% en el tampón de unión y se determinaron las fracciones que contenían proteína mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). La proteína de fusión purificada se cortó con la proteasa Factor Xa (New England BioLabs) a una concentración de 20 µg/mg de proteína y se aplicó a una columna mono-Q (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfee, Canadá). La SP1 recombinante sin vehículo MBP se eluyó de la columna mediante la utilización de un gradiente lineal de NaCl (NaCl 0 a 0,4 M en Tris-HCl 20 mM, pH 7,4). Se agruparon las fracciones que contenían SP1 y se dializaron frente a tampón PBS. La pureza de la SP1 recombinante se evaluó mediante SDS-PAGE y se determinó la concentración de la proteína mediante el ensayo de proteínas Bradford (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

SDS-PAGE e inmunotransferencia western. Se llevó a cabo una SDS-PAGE tal como describe Laemmli (21). Se separó el extracto celular total o la proteína purificada en un gel de acrilamida al 10% y seguidamente el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie R250 (Sigma, St. Louis, Mo). Se utilizaron marcadores de masa molecular baja preteñidos (Bio-Rad) para determinar los pesos moleculares aparentes de las proteínas. Alternativamente, se llevó a cabo una transferencia western de las proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa, esencialmente tal como indica Burnette (5).

Microscopía inmunoelectrónica. Se cultivó la cepa S735 de *S. suis* en 5 ml de THB durante la noche, se centrifugó y se resuspendió en 500 µl de PBS (pH 8,0). Se introdujeron 20 µl de la suspensión bacteriana en rejillas de níquel-formvar (INRS, Institut Armand Frappier, Laval, Canadá) y se dejaron secar al aire parcialmente. Tras bloquear durante 30 min. con suero normal de burro al 10% en tampón de dilución (PBS- albúmina bovina al 1%-Tween-20 al 1%, pH 8,0), las rejillas se sumergieron en 50 µl de suero de conejo específico de SP1 o suero de conejo anti-MBP de control (New England BioLabs) diluido 1/25 en el tampón de dilución durante 2 h a temperatura ambiente. Las rejillas se lavaron tres veces en PBS-Tween-20 al 1% y después se transfirieron a 50 µl de oro coloidal de 12 nm-anticuerpo de burro anti-IgG de conejo Affinipure (Jackson Immuno Research Laboratories) diluido 1/30 en el tampón de dilución y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS-Tween-20 al 1% y un lavado con agua destilada, las bacterias se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 1% y se examinaron con un microscopio electrónico (Philips 201) a un voltaje de aceleración de 60 kV.

Inmunización y estudio de protección. Se utilizaron cerdos para llevar a cabo la inmunización y ensayo de protección en VIDO (Saskatoon, Canadá) siguiendo los principios indicados de manera general en el documento titulado "Guide to the care and use of experimental animals" del Canadian Council on Animal Care utilizando un protocolo que ha sido aprobado por el University Committee on Animal Care (37). Se asignaron aleatoriamente a dos grupos de ocho

lechones de tres semanas de edad con un peso medio de 8,23 kg procedentes de una piara libre de *S. suis* de serotipo 2. Los cerdos recibieron dos inyecciones por vía intramuscular, separadas por 3 semanas, de 1 ml con 100 µg de SP1 purificada y mezclada con adyuvante Emulsigen-Plus al 30% (MVP Laboratories, Ralston, Nebr.) o Emulsigen-Plus al 30% en solución salina fisiológica a modo de control. Once días después de la segunda inyección, los animales inmunizados y de control fueron retados con un 1 ml de aerosol ($4,6 \times 10^6$ UFC) de un cultivo en etapa logarítmica de *S. suis* cepa virulenta 166, que se había confirmado que era altamente virulenta (3). Se recogieron muestras de sangre antes de cada inyección, en el momento de la provocación y al final del experimento, a fin de determinar las respuestas de anticuerpos. Se realizó un seguimiento de los cerdos diariamente para signos clínicos, temperatura corporal y mortalidad durante diez días después de la provocación. Todos los cerdos fueron examinados post-mórtem para patología macroscópica y se cultivó la sangre con el fin de detectar la presencia de bacteremia de *S. suis*.

ELISA. Se determinó la IgG total específica de SP1 y de isotipos de IgG (IgG1 e IgG2) de lechones inmunizados mediante ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA). Se recubrieron durante la noche placas Polysorb (Nunc-Immunoplates, Rochester, New York, USA) durante la noche a 4°C con 100 µl por pocillo de la SP1 recombinante purificada a una concentración de 0,3 µg/ml en tampón de carbonato. Tras tres lavados con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (PBST), las placas se bloquearon con leche desnatada al 5% en PBST durante 1 hora a 37°C. Para la determinación de IgG total, se diluyeron sueros de cerdo a partir de los grupos de vacuna y control en una proporción de 1/5000 en PBST y se añadieron a los pocillos apropiados por duplicado a razón de 100 µl en cada pocillo. Tras la incubación durante 1 h a 37°C y el lavado tres veces, se detectaron los anticuerpos unidos mediante incubación durante 1 h a 37°C con antisueros de cabra anti-IgG(H+L) de cerdo conjugados con peroxidasa (Jackson Immuno Research Laboratories). Para la detección de IgG1 e IgG2, se añadieron sueros de cerdo diluidos 1/500 del grupo de vacunación a razón de 100 µl en cada pocillo. Se utilizó anticuerpo de ratón anti-IgG1 o anti-IgG2 porcino (Serotec, Kidlington, Oxford, Reino Unido) como anticuerpo primario y anticuerpo de cabra anti-IgG(H+L) de ratón conjugado con peroxidasa (Serotec) como anticuerpo secundario. Las placas se revelaron con sustrato TMB (Zymed, S. San Francisco, USA). Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA (Power Wave 340, Bio-Tek Instruments, Inc.). Los resultados se expresan como medias \pm S.D. La significancia estadística se determinó mediante pruebas t de Student.

Número de acceso de las secuencias de nucleótidos. La secuencia del gen codificante de la proteína SP1 de *S. suis* se muestra en la figura 2 y se ha asignado el número de acceso de GenBank AY864331.

Resultados

Identificación del gen *sp1*. Se construyó la biblioteca cromosómica de *S. suis* a partir de la cepa S735 de *S. suis* en λ ZAPII y se cribó utilizando sueros de cerdos convalecientes de animales infectados por *S. suis* serotipo 2. Un clon, que expresaba una proteína con un peso molecular aparente (PM) de 110 kDa que era fuertemente reactiva con el suero de cerdos convalecientes, se seleccionó para la caracterización adicional. El plásmido pBluescript recombinante, denominado pSS735, se extrajo de los brazos del bacteriófago y se presenta en la fig. 1 su organización esquemática. El análisis de la secuencia de ADN de la inserción de 6.057 pb del pSS735 reveló cuatro ORF. Se descubrió esta agrupación génica en los genomas parcialmente secuenciados de *S. suis* cepa canadiense 89/1591 (NZ_AAFA00000000) y en la cepa europea P1/7 (NC_004549) con la misma organización. Las secuencias de aminoácidos deducidas de tanto ORF1 como ORF2 mostraban identidades comprendidas en el intervalo de entre 50% y 80% respecto a una glucosil-transferasa, y el ORF4 mostró identidades comprendidas en el intervalo de entre 50% y 75% respecto a una proteína activadora por catabolito A de muchas especies bacterianas, la mayoría de ellas pertenecientes al género *Streptococcus*. El ORF3 codifica una proteína de 670 aminoácidos, denominada SP1, con un pl predicho de 6,0 y una masa molecular calculada de 74,8 kDa. La comparación de la secuencia de aminoácidos de SP1 con las presentes en las bases de datos disponibles no reveló ninguna homología significativa respecto a otras proteínas. El análisis de subclonación de la secuencia de *sp1* en el vector pMal-p reveló que SP1 reaccionaba fuertemente con el suero de cerdos convalecientes, demostrando que SP1 es la proteína inmunogénica.

SP1 es una nueva proteína de superficie anclada C-terminalmente de *S. suis*. Las 2.010 pb del gen *sp1* se inician con un codón ATG precedido por una secuencia de Shine-Dalgarno putativa (GAAAGGA) 10 pb cadena arriba del codón de inicio y que termina con un codón TAA (fig. 2). El análisis de la secuencia de aminoácidos de SP1 predicha reveló un núcleo hidrofóbico de 15 aminoácidos en el extremo N-terminal y un sitio de corte de peptidasa de señal putativo entre Ala²⁹ y Gln³⁰. Se detectaron diez repeticiones de una secuencia de 27 aminoácidos con un fuerte patrón de consenso, separadas por espaciadores de 3 residuos aminoácidos, dentro de la mitad carboxilo de la proteína. En el lado inmediatamente C-terminal de la región repetida se encuentra una región asociada a la pared celular que comprende 49 residuos aminoácidos y se caracteriza por un elevado porcentaje de residuos treonina (20,4%). A esta región rica en treoninas le sigue inmediatamente un motivo de consenso LPVTG típico de las proteínas de superficie ancladas a membrana de muchas bacterias Gram-positivas. A partir de cuatro aminoácidos en el lado C-terminal respecto al motivo de anclaje membranal se identificó un segundo segmento hidrofóbico de 16 aminoácidos seguido de cuatro residuos aminoácidos con carga positiva en el extremo C-terminal de la proteína (fig. 2).

El análisis de la composición de aminoácidos reveló una región de ausencia de residuos aromáticos entre Glu²⁷² y

Thr⁶³⁰ que comprendía la totalidad de las secuencias repetidas. Además, una búsqueda de dominios conservados utilizando BLAST identificó un dominio de avirulencia en la región de Lys³¹⁹ a Val⁶⁰¹, que mostraba una similitud con el factor de avirulencia AvrXa7 del patógeno vegetal *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (41) con una identidad de 20% (fig. 3). Al considerar las sustituciones conservadoras de aminoácidos, la similitud era de 48%.

Producción de SP1 recombinante. La secuencia codificante de la proteína SP1 madura se amplificó mediante PCR y se ligó en el vector pMAL-p inducible por IPTG. El plásmido recombinante resultante se expresó en *E. coli* cepa XL1-Blue. Tal como se muestra en la fig. 4A, la inducción de los *E. coli* recombinantes que incluían el gen de fusión *malE-sp1* condujo a la expresión de una proteína de fusión MBP-SP1 de aproximadamente 150 kDa (carril 2) que se encontraba ausente en las células de *E. coli* no inducidas (carril 1). La proteína de fusión se encontró mayoritariamente en el citoplasma de las células de *E. coli* (carril 3). Resulta interesante que una proteína de fusión MBP-SP1 truncada en la que la región repetida caracterizada por la ausencia de sustituciones aromáticas se había deletado, resultó totalmente transportada al interior del espacio periplásmico (datos no representados), lo que sugiere que dicha región interfirió de alguna manera con la localización de MBP.

La proteína de fusión se purificó mediante la utilización de una columna de amilosa de matriz de afinidad y la elución con maltosa, y mostró una única banda de proteínas de aproximadamente 150 kDa en el SDS-PAGE (carril 4). La proteína de fusión purificada se cortó proteolíticamente con el factor Xa, rindiendo los 110 kDa aparentes de SP1 madura y los 45 kDa esperados de etiqueta MBP (carril 5). La SP1 madura sin MBP se obtuvo mediante la posterior purificación mediante cromatografía de intercambio iónico, con una pureza >95% estimada mediante SDS-PAGE (carril 6). Tanto la proteína de fusión MBP-SP1 como la SP1 recombinante purificada demostraron una reactividad específica en una transferencia western con el suero de cerdos convalecientes utilizado para el cribado inicial de la biblioteca genómica (fig. 4B). Se confirmó la identidad de la SP1 purificada mediante secuenciación N-terminal de la proteína. Se midió la concentración de la proteína con un ensayo de proteínas Bradford y se ajustó a 1 mg/ml.

Expresión en la superficie celular de SP1 en *S. suis*. Con el fin de confirmar la localización de SP1 sobre la superficie de las células de *S. suis*, se llevó a cabo microscopía inmunoelectrónica mediante la utilización de un anticuerpo policlonal mono específico anti-SP1, R44. Se encontraron partículas de inmuno-oro uniformemente distribuidas sobre la superficie de la cepa S735 de *S. suis*. Lo anterior indica que la proteína SP1 se expresa homogéneamente sobre la superficie celular. Se utilizó el suero de conejo anti-MBP como control y no mostró ningún marcaje (fig. 5).

Distribución de SP1 entre *S. suis*. Con el fin de evaluar la conservación de SP1 entre las cepas de referencia de diferentes serotipos de *S. suis* y cepas de campo de serotipo 2, se aplicaron preparaciones de células completas de las bacterias a filtros de transferencia western y se detectaron con el anticuerpo R44 específico de SP. Tal como se muestra en la tabla 1, excepto para las cepas de los serotipos 13, 16, 20, 22 y 24, R44 reaccionó con otros 28 serotipos de *S. suis*, mientras que 25 de los 26 aislados de tipo 2 sometidos a ensayo de diferente origen geográfico reaccionaron con el anticuerpo R44. Se utilizaron cinco cepas de otras especies de estreptococos para verificar la especificidad de SP1 y no se detectó ninguna proteína SP1.

Inmunogenicidad de SP1 y protección de los cerdos frente a la provocación con *S. suis*. Se inmunizaron grupos de 8 lechones dos veces por vía intramuscular con 100 µg de SP1 recombinante purificada emulsionada con el adyuvante o con solo adyuvante. La inmunización de cerdos con SP1 indujo una respuesta específica de antígeno (fig. 6A). El análisis de los sueros correspondientes obtenidos de los animales de control y de los animales antes de la inmunización claramente indicó la ausencia de anticuerpo específico de SP1, ya que sólo se registraron valores de ELISA de fondo. Sólo dos semanas después de la primera inyección, SP1 indujo una respuesta de IgG significativa que resultó evidentemente incrementada por la inmunización de refuerzo. La evaluación de los isotipos de IgG demostró que los sueros procedentes de cerdos inmunizados contenían anticuerpos tanto IgG1 como IgG2 (fig. 6B). Sin embargo, la respuesta de IgG1 dominó sobre la de IgG2, sugiriendo que la vacunación con SP1 inducía principalmente la respuesta inmunitaria de tipo Th2. La provocación con aerosol de los cerdos con *S. suis* cepa 166 resultó en incrementos constantes de la puntuación clínica desde el día 2 después de la provocación y no se observó ningún efecto significativo de la vacunación. Tal como se resume en la tabla 2, aunque menos cerdos sufrieron artritis en el grupo vacunado que en el grupo de control, ambos grupos mostraron síntomas similares después de la provocación. Murieron tres cerdos de cada grupo o fueron sometidos a eutanasia debido a las elevadas puntuaciones clínicas antes del final del experimento. Se observó bacteremia de *S. suis* en todos los cerdos muertos y no se detectó en los cerdos supervivientes.

Comentario

La primera inmunización de los cerdos indujo una rápida respuesta humoral de anticuerpos específica de SP1 que pudo reforzarse significativamente con una inyección posterior. Sin embargo, el anticuerpo contra SP1 no confirió inmunidad frente a una provocación heteróloga con *S. suis* cepa 166. Esta discrepancia entre las respuesta de anticuerpos y la protección se ha informado en algunos otros antígenos de superficie de bacterias Gram-positivas, tales como la proteína de unión a fibronectina estreptocócica (Sfb1) (26), proteína A de superficie neumocócica (PspA) (27), polisacárido de grupo B (25) y proteína de tipo M (SeM) de *Streptococcus equi* (34). No se conoce el motivo por el que los anticuerpos contra SP1 no eran protectores frente a la provocación por *S. suis* 166. En un

estudio de eliminación fagocítica, la presencia de suero agrupado de los cerdos inmunizados con SP1 no estimuló la eliminación de *S. suis* por los neutrófilos porcinos, lo que sugiere que los anticuerpos no presentan función opsonofagocítica. La protección del hospedador frente a la infección causada por *S. suis*, un microorganismo altamente encapsulado, se encuentra mediada principalmente por la fagocitosis (32). Por lo tanto, los niveles totales de IgG generados en el modelo de vacunación convencional del solicitante podrían no reflejar adecuadamente la presencia de anticuerpos protectores que son capaces de inducir funciones efectoras de leucocitos. A fin de ilustrar adicionalmente los tipos de respuesta inmunitaria inducidos por SP1, se evaluaron los isotipos de IgG en los sueros inmunizados. Los niveles de IgG1 eran consistentemente más altos que los niveles de IgG2, lo que sugiere la inducción de respuestas de tipo Th2. Aunque el concepto de equilibrio "Th1/Th2" no está tan bien documentado en cerdos como en algunas otras especies, la evidencia reciente demuestra que la IgG2 porcina presenta una capacidad activadora del complemento mayor que IgG1 (6).

Se utilizó Emulsigen-Plus como adyuvante en el presente estudio porque se cree que puede crear un reservorio de antígenos en el sitio de inoculación desde el que se libera lentamente el antígeno, proporcionando de esta manera una estimulación prolongada del sistema inmunitario (23, 37). Sin embargo, la evidencia reciente demuestra que la vacuna formulada con Emulsigen por sí solo induce predominantemente una respuesta de IgG1 pero una respuesta inmunitaria de tipo Th1 muy débil (19, 28). La evidencia de vacunación con antígenos de superficie de otras bacterias Gram-positivas ha demostrado que la eficiencia de la opsonofagocitosis puede incrementarse drásticamente mediante la utilización de adyuvantes polarizantes de Th1, tal como CpG e interleuquina-12 (IL-12) (4, 22, 24). Estos adyuvantes inducen una respuesta inmunitaria de tipo Th1 caracterizada por la producción incrementada de anticuerpos opsonizantes, especialmente del isotipo IgG2. Además, la opsonización mediada por anticuerpos incrementada se reflejó claramente en protección (2, 40).

En conclusión, SP1 es una nueva proteína de superficie anclada C-terminalmente de *S. suis*, tal como demuestra el análisis de las características moleculares y la microscopía electrónica. La vacunación con la SP1 recombinante indujo una respuesta humoral de anticuerpos significativa en lechones, conjuntamente con el hecho de que los sueros de cerdos convalecientes presentaban títulos elevados de anticuerpos contra dicha proteína, lo que sugiere que la SP1 es un antígeno expuesto de *S. suis*. Conjuntamente con su amplia distribución en diferentes serotipos de *S. suis*, estos resultados convierten a la SP1 en un candidato a considerar en el desarrollo de una vacuna de subunidades. El potencial de SP1 como candidato de vacuna se demuestra en los ejemplos a continuación.

Ejemplo 2

SP1 recombinante protege a ratones frente a la provocación de infección por *S. suis*

El presente estudio evalúa si la proteína SP1 recombinante es protectora como vacuna de subunidades candidata en un modelo de ratón con una vía de inmunización y adyuvante modificados.

Procedimiento experimental: se asignaron aleatoriamente ratones (CD1) a dos grupos de diez y se inmunizaron por vía subcutánea dos veces a intervalos de 2 semanas con 20 µg de SP1 purificada y mezclada con 20 µg de Quil A como adyuvante o 20 µg de Quil A únicamente como control (tabla 1). Diez días después de la segunda vacunación, los animales se retaron i.p. con 1×10^8 UFC de una cepa virulenta de *S. suis* (31533). Se realizó un seguimiento de los ratones dos veces al día para signos clínicos y mortalidad hasta el día 14 después de la infección. Se recogieron muestras de sangre antes de cada vacunación y provocación para determinar las respuestas de anticuerpos.

Resultados: la vacunación con SP1 indujo respuestas humorales de IgG significativas en los ratones tras la inmunización primaria (título medio: 3×10^4) y una inyección de refuerzo incrementó significativamente el título de anticuerpos ($1,8 \times 10^6$). En contraste, las IgG específica de SP en los sueros del grupo de control se encontraba a nivel indetectable (fig. 1). Además, se indujo la totalidad de las cuatro subclases de IgG en los ratones inmunizados con SP1, siendo el título de IgG2a el más alto ($1,75 \times 10^6$), seguido de IgG1 ($1,2 \times 10^6$), IgG2b ($7,25 \times 10^5$) e IgG3 ($3,7 \times 10^4$) (fig. 2). Se demostró la especificidad de los anticuerpos inducidos por SP1 en una transferencia western en la que los sueros agrupados recogidos de ratones inmunizados con SP1 podían reconocer la SP1 purificada y la proteína SP1 en preparaciones celulares de *S. suis* S735 y 31533.

Dieciséis horas después de administrar la infección de provocación, todos los ratones en el grupo de control empezaron a mostrar signos clínicos (septicemia), tal como una capa de pelo erizado (sugestiva de fiebre) y una respuesta lenta a los estímulos. Desde el día 4 después de la provocación, 8 de 10 ratones en este grupo desarrolló sucesivamente síntomas severos en el sistema nervioso central (meningitis), tal como el correr en círculos y opistotonos. La totalidad de los 8 ratones enfermos murió o debió ser eutanizado debido a la severidad de la condición. En contraste, excepto 6 de los 10 ratones en el grupo vacunado con SP1 presentaba signos clínicos transitorios, tal como pelo ligeramente erizado y reticencia a moverse durante 16 a 40 horas después de la provocación; todos los ratones en este grupo se conservó sano durante el periodo de observación (figs. 3 y 4).

Comentario y conclusión: la diferencia de protección observada en los modelos de ratón y de cerdo se explica por los niveles de subclases de IgG bien equilibrados que se indujeron en el modelo de vacunación en el ratón, especialmente el título de IgG2a extremadamente alto. Entre los isotipos de anticuerpo murino, se demostró que

IgG2a resultaba más eficaz en la activación de la función opsonofagocítica de los leucocitos (2, 42, 43). Además, *S. suis*, una bacteria encapsulada, resultó más eficazmente eliminada mediante opsonofagocitosis. De esta manera, resulta probable que la producción predominante de IgG2 contribuyese más a la protección observada. Sin embargo, estos datos indican que la inmunización de los ratones con SP1 mediante la utilización de un adyuvante que dirige a Th1, tal como Quil A, puede inducir una respuesta específica de antígeno eficiente y proteger a los ratones frente a la provocación de infección con una dosis letal de una cepa virulenta de *S. suis* y resultar en la protección completa frente a la muerte por *S. suis* (fig. 4).

Ejemplo 3

Identificación de un nuevo gen codificante de una proteína de *Streptococcus suis* con actividad de unión a IgG y capacidad protectora

En el esfuerzo continuo del solicitante por entender el mecanismo patogénico de *S. suis* y por encontrar la proteína o proteínas del mismo que podrían resultar útiles en el desarrollo de un reactivo o vacuna diagnóstico fiable, se identificó una nueva proteína que mostraba actividad de unión a IgG a partir de una cepa virulenta de *S. suis* de serotipo 2. Esta proteína de 58 kDa aparentes denominada SP2 contenía una secuencia de señal N-terminal cortable de 23 aminoácidos y un motivo M de lisina próximo al extremo N-terminal y seis repeticiones idénticas de 13 aminoácidos, cada uno dentro de la parte C-terminal. SP2 se encontraba altamente conservada en los diferentes serotipos de *S. suis* tal como demostró la amplificación por PCR del gen SP2. La SP2 recombinante reaccionaba fuertemente con un suero de cerdos convalecientes obtenido de cerdos infectados clínicamente por *S. suis* de tipo 2. La inmunización de los ratones con la SP2 recombinante purificada indujo una respuesta de anticuerpos significativa que confirió una protección parcial frente a la provocación de infección con una cepa virulenta de *S. suis*.

Dichos resultados demuestran que SP2 es un potencial agente diagnóstico y un candidato a vacuna para la infección por *S. suis*.

Procedimientos experimentales y resultados

Identificación del gen SP2

Se identificó un fago positivo que reaccionaba mediante un mecanismo no inmunitario con diferentes clases y especies de Ig (IgG de cerdo, IgG e IgA humanas) mediante cribado de la biblioteca genómica de *S. suis* de serotipo 2 construido. La secuencia de la inserción de ADN reveló una inserción de 6,3 kb que contenía tres MLA codificantes de deshidrogenasas, SP2 y dextrano glucosidasas (44), respectivamente (fig. 12). Esta agrupación génica se encontró en los genomas secuenciados parcialmente de *S. suis* cepa canadiense 89/1591 (NZ_AAFA00000000) y la cepa europea P1/7 (NC_004549) con la misma organización. La secuencia de aminoácidos de SP2 presentaba similitudes con algunas proteínas estreptocócicas que habitualmente muestran actividad de unión a Ig. Se observó una identidad de 45% respecto a un tramo de 395 aminoácidos con una proteína hipotética conservada de *Streptococcus pneumoniae* (AAL00677). Se encontraron otras homologías con una proteína putativa de 42 kDa de *Streptococcus pyogenes* (identidad de 45% con un tramo de 388 aminoácidos) (AAK33481) y con una proteína inmunogénica de superficie estreptocócica de grupo B (identidad de 40% respecto a un tramo de 434 aminoácidos) (60) (AAG18474).

Caracterización de la proteína SP2

El gen SP2 de 1.158 pb codifica una proteína SP2 de 386 aminoácidos con un pl teórico de 4,40 y una masa molecular de 42,5 kDa. Esta proteína es rica en valinas (15%), ácidos glutámicos (10%) y alaninas (9%). El análisis de la distribución de las cargas de SP2 reveló una agrupación de carga positiva ($K^2 - K^{26}$) en el extremo N-terminal y una agrupación de carga negativa ($D^{168} - E^{242}$) en la parte intermedia de la proteína (fig. 13). Después de la agrupación de carga positiva se encontraba una secuencia de señal putativa de 23 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de SP2 contenía un motivo LysM (lisina) en las posiciones 71 a 109. Este dominio LysM se encuentra en una diversidad de enzimas que participan en la degradación de la pared celular bacteriana y presenta una función general de unión de peptidoglicano, lo que sugiere que SP2 podría ser una proteína de superficie de *S. suis*. De esta manera, la constitución N-terminal de SP2 indicaba de manera general la posibilidad de que la agrupación de carga positiva remanente en el citoplasma funcionase como parada temporal y ayudase en la formación de la SP2 madura mediante el corte de la secuencia de señal y en la localización de SP2 sobre la superficie bacteriana mediante la unión del dominio LysM al peptidoglicano. Además, se identificaron seis secuencias repetitivas idénticas de 13 aminoácidos en la parte intermedia de SP2 (fig. 13).

Distribución del gen SP2 en diferentes serotipos de *S. suis*

Con el fin de evaluar el nivel de conservación de SP2, se llevó a cabo una PCR utilizando cebadores que cubrían el gen SP2 de longitud completa. Se llevó a cabo la PCR con una desnaturalización inicial de 94°C durante 5 min. seguida de 30 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 52°C y 2 min. a 72°C, y un periodo final de elongación de 10 min. a 72°C.

Los cebadores directo e inverso utilizados para la distribución de SP2 en diferentes serotipos fueron, respectivamente:

5 (5'-TTTAAAGAACGGTTGAAGGC-3', SEC ID nº 15, y 5'-GCATAAGCTGCCACTTGATCT-3', SEC ID nº 16).

Se amplificó el gen *SP2* de 31 de las 33 cepas de referencia de serotipo con algunas variaciones de tamaño (fig. 14). El análisis de secuencias de los fragmentos de las variantes seleccionadas sugiere que el número de repeticiones en el gen *SP2* es responsable de las variaciones de tamaño.

10

Producción y purificación de SP2 recombinante

El gen codificante de la SP2 madura se generó mediante PCR a partir del cromosoma de *S. suis* S735 y se subclonó en un vector pET32+ (New England BioLabs). Se utilizó el constructo para transformar *E. coli* cepa DE3 mediante electroporación con el aparato Genepulse II (Bio-Rad) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para la sobreexpresión, el cultivo se inoculó a partir de un cultivo de durante la noche con la DO₆₀₀ inicial del mismo ajustada a 0,1. El cultivo se incubó bajo agitación hasta una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,8 y después se añadió IPTG (0,5 mM) con el fin de inducir la producción de la proteína de fusión Trx-His-SP2. Transcurridas 2 horas desde la inducción, se preparó el citoplasma bacteriano y se utilizó para la purificación de la proteína SP2.

15

20

Se purificó la proteína de fusión Trx-His-SP2 a partir del citoplasma mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni⁺ (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfee, Canadá). El citoplasma se filtró a través de una membrana de 0,45 µm y se sometió a la columna. La proteína de fusión se eluyó con imidazol 500 mM en tampón de unión y se determinaron las fracciones que contenían proteína mediante SDS-PAGE. La proteína de fusión purificada se cortó con 0,001% (p/p) de enteroquinasa (New England BioLabs), rindiendo una SP2 de 58 kDa aparentes y la etiqueta esperada Trx-His de 20 kDa (fig. 15) y después se aplicó a una columna mono-Q (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfee, Canadá). La SP2 recombinante sin etiqueta Trx-His se obtuvo mediante elución de la columna utilizando un gradiente lineal de NaCl, con una pureza estimada superior a 95% según visualización mediante SDS-PAGE (fig. 15). Se determinó la concentración de las proteínas mediante el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se confirmó la identidad de la SP2 purificada mediante secuenciación de proteínas N-terminal.

25

30

SP2 es una proteína inmunogénica de *S. suis* y muestra actividad de unión a IgG

Se generó un anticuerpo específico de SP2 mediante inmunización por vía intramuscular de los conejos New Zealand White con 100 µg de proteína SP2 recombinante emulsionada con 0,5 ml de adyuvante incompleto de Freund. Los conejos recibieron dos inyecciones de refuerzo con la misma dosis de la SP2 a intervalos de 2 semanas, seguido de la extracción de muestras de sangre 10 días después de la última inmunización de refuerzo. A la inversa, el anticuerpo específico de SP2 reconoció SP2 en la preparación de células *S. suis* en una transferencia western (fig. 16a). Además, la SP2 recombinante reaccionó con suero de cerdos convalecientes (fig. 16b), demostrando que el anticuerpo anti-SP2 existe en el suero de los cerdos clínicamente infectados por *S. suis*.

35

40

Las actividades de unión de la SP2 recombinante a IgG humana y de cerdo se muestran en las figuras 16c y 16d.

45

La SP2 recombinante protege parcialmente a los ratones frente a la provocación de infección por *S. suis*

Se asignaron aleatoriamente los ratones (CD1) a dos grupos de once (grupo de vacunación) y diez (de control) y se inmunizaron por vía subcutánea dos veces a intervalos de 2 semanas con 50 µg de SP2 purificada y mezclada con 20 µg de Quil A como adyuvante que dirige a Th1 o 20 µg de Quil A únicamente como control. Diez días después de la segunda vacunación, los ratones se retaron por vía i.p. con 1x10⁸ UFC de una cepa virulenta de *S. suis* (31533). Se realizó un seguimiento de los ratones dos veces al día para signos clínicos y mortalidad hasta el día 14 después de la infección. Se recogieron muestras de sangre antes de cada vacunación y se retaron para determinar las respuestas de anticuerpos.

50

55

La vacunación con SP2 indujo respuestas humorales de IgG significativas en los ratones. En contraste, la IgG específica de SP2 en los sueros del grupo de control se encontraba a un nivel no detectable (fig. 17). Ambos grupos mostraron signos clínicos de septicemia y meningitis. Sin embargo, las puntuaciones clínicas en el grupo de vacunación con SP2 eran menores que en el grupo de control (fig. 18). De los 11 ratones en el grupo de vacunación con SP2, 4 murieron o debieron ser eutanizados debido a la gravedad de la afección (tasa de supervivencia=64%). En contraste, 8 de 10 ratones en el grupo de control murieron (tasa de supervivencia=20%) (fig. 19). Estos resultados demuestran que SP2 protege a los ratones frente a la provocación de infección por *S. suis*.

60

Conclusión

SP2 es una proteína inmunogénica de *S. suis* nuevamente descrita que comparte poca identidad con otras secuencias conocidas. Los sueros de cerdos convalecientes presentaban anticuerpos contra dicha proteína,

65

demostrando que SP2 es un potente antígeno que se expresa durante la infección por *S. suis*. Estos resultados, conjuntamente con su amplia distribución en diferentes serotipos de *S. suis*, convierten a SP2 en un candidato para la consideración en el desarrollo de un reactivo diagnóstico. Debido a que la vacunación de los ratones con SP2 recombinante resulta en protección, resulta evidente de esta manera que SP2 es un potencial candidato a la vacunación contra la infección por *S. suis*.

Ejemplo 4

Efecto de la inmunización de lechones con una vacuna experimental de *Streptococcus suis*

El presente estudio evalúa el efecto de protección de la proteína Sao recombinante frente a la provocación de infección por *S. suis* serotipo 2 en lechones.

Materiales y métodos

Animales, asignación al tratamiento y criterios de exclusión:

Se utilizó un total de 24 lechones cruzados de una piara libre de enfermedad de *S. suis* (H & M Fast Farms Inc.) sin ninguna vacunación previa frente a *S. suis*. Los cerdos se mantuvieron bajo condiciones comerciales en la piara de origen desde el nacimiento hasta el destete con un peso medio de 7,79 kg a los 23,5 días de edad. Los cerdos se alojaron bajo temperatura controlada (27°C a 30°C) y ventilación, sobre suelo metálico recubierto con vinilo y se les proporcionó agua mediante bebedero de tetilla y dispusieron de libre acceso a alimentos de preparación comercial, nutricionalmente equilibrados y sin antibióticos. Un veterinario examinó los cerdos antes de iniciar el estudio. Todos estaban sanos. En el momento del destete, los lechones fueron asignados aleatoriamente a dos grupos, balanceados según peso corporal.

Grupo 1: 200 µg de Sao y 400 µg de Quil A en 1 ml de solución salina

Grupo 2: 400 µg de Quil A en 1 ml de solución salina (control)

Cualesquiera animales que hubiesen recibido un tratamiento no deseado o que habían sucumbido a una enfermedad no relacionada fueron excluidos del análisis.

Vacunación y provocación:

Todos los cerdos fueron vacunados i.m. con 1 ml dos veces separadas por 2 semanas. Se recogieron muestras de sangre antes de cada inyección y provocación. No se observaron sucesos adversos como resultado de dichos tratamientos.

Dos semanas después de la segunda vacunación, los cerdos fueron anestesiados con halotano y se retaron con aerosol de 1 ml de una suspensión de *S. suis* 166. Las bacterias procedían de un cultivo en etapa logarítmica cultivado en caldo de levadura de Todd-Hewitt esterilizado mediante filtración a una DO₆₂₀ de 0,8 y se diluyeron 1:100 en solución salina (NaCl al 0,85%). La concentración bacteriana administrada en los cerdos se estimó posteriormente en 6,8x10⁶ UFC/ml.

Observaciones clínicas:

Un veterinario o técnico capacitado en el cuidado animal evaluó clínicamente los cerdos una vez al día y midió las temperaturas corporales durante la evaluación de las puntuaciones clínicas cada mañana durante diez días después de la provocación. Se obtuvo una puntuación clínica diaria (de 0 a 4) como suma de las puntuaciones de altitud y locomoción para cada animal basándose en los signos de enfermedad nerviosa, musculoesquelética o respiratoria, de la manera siguiente:

Actitud:

0=Actitud y respuesta a estímulos normales

1=Inactivo y de respuestas lentas; secreciones oculonasales

2=Sólo responde a estímulos repetidos, apático

3=Acostado, no responde, no es consciente de su entorno

4=Muerto

Locomoción:

0=Marcha y postura normales

1=Ligera descoordinación, cojera y/o inflamación articular, aunque sin levanta sin ayuda

2=Clara descoordinación o cojera aunque se mantiene de pie sin ayuda

3=Cojera severa, ataxia severa, aunque se mantiene en pie

4=Muerto

Los cerdos que presentaban una puntuación clínica superior a 2 en cualquiera de las dos escalas fueron sometidos a eutanasia mediante inyección letal. Los cerdos con temperaturas rectales iguales o superiores a 40,6°C y una puntuación clínica superior a 0, así como aquellos cerdos ya muertos, se registraron como enfermos en ese día. Los cerdos que habían muerto o habían sido sometidos a eutanasia antes del final del experimento el día 9 se registraron como muertos para la evaluación del efecto del tratamiento sobre la tasa de mortalidad. Todos los individuos que realizaron evaluaciones de los animales, de los signos clínicos de enfermedad o que realizaron ensayos de laboratorio eran ciegos a la identidad del tratamiento.

Estado hematológico:

Se obtuvo una muestra de sangre tratada con heparina mediante venipunción para la detección de bacteremia de *S. suis* (mediante cultivo los días 0 y 3 después de la provocación y *post mortem*).

Título de anticuerpos:

Se determinaron mediante ELISA los títulos de IgG total y subclases de IgG (IgG1 e IgG2) específicas de Sao en los sueros. La dilución del suero que resultaba en una lectura de DO450 de 0,1 tras restar el fondo se consideró el título del suero.

Necropsia:

Todos los cerdos fueron examinados *post mortem* y se cultivaron los tejidos siguientes para bacterias: hisopo de cerebelo, nódulo linfático traqueobronquial, hisopo de articulación (una articulación afectada en caso de observar lesiones; en caso contrario, una articulación de rodilla posterior) y sangre. Se registró el número de bacterias *S. suis* recuperadas en una escala ordinal de 0 a 4 (aproximación de \log_{10} número de colonias). Además, se estimó la extensión (porcentaje) de afectación pulmonar mediante examen visual.

Análisis estadísticos

Se determinó la significancia de las diferencias entre grupos en los datos nominales (mortalidad, presencia o ausencia de *S. suis* en los tejidos, días enfermos o sanos) utilizando un análisis de tablas de contingencia y la prueba exacta de Fisher de proporción de probabilidades. Se transformó la significancia de las diferencias en los datos ordinales (puntuaciones clínicas) se transformó mediante asignación a rangos y se determinó en pruebas t. La significancia de las diferencias entre grupos en las curvas de supervivencia se determinó mediante análisis de supervivencia utilizando la prueba de rangos logarítmicos (equivalente a la prueba de Mantel-Haenszel). Se determinó la significancia de las diferencias entre grupos en datos continuos (longitud de la supervivencia después de la provocación, temperatura corporal, \log_2 UFC/ml de sangre) utilizando una prueba t (tras la transformación apropiada para la normalización, según resultase necesario).

Resultados

Animales excluidos:

Un cerdo fue sometido a eutanasia el día 5 tras la provocación debido a un prolapso rectal agravado persistente. Este cerdo fue excluido del análisis.

Observaciones clínicas:

1. *Respuesta a la inmunización*: no se observaron reacciones no habituales atribuibles a la vacunación.
2. *Temperatura corporal*: los datos de temperatura corporal analizados mediante pruebas t no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos ($p > 0,05$). Generalmente los cerdos vacunados tendieron a presentar temperaturas inferiores (fig. 20).
3. *Enfermedad clínica*: la "puntuación clínica" es una medida de la cantidad de enfermedad e incorpora tanto la

mortalidad como la morbilidad. Se compararon los dos grupos utilizando el análisis de Mann-Whitney de un efecto de la vacuna sobre la puntuación clínica y la enfermedad clínica en el grupo vacunado era significativamente inferior que en el control ($p=0,024$) (fig. 21).

- 5 4. *Supervivencia de cerdos tras la provocación de S. suis*: la tasa de supervivencia era de 82% en el grupo de vacunación y de 42% en el grupo de control, respectivamente. La comparación de las curvas de supervivencia utilizando los dos grupos de datos, demuestra que el tiempo de supervivencia de los cerdos vacunados era significativamente más largo que el del control ($p=0,048$) (fig. 22).

10 Bacteriología

1. *Bacteremia*: las bacterias en la sangre de los lechones eran no detectables (ND) antes de la provocación. Los cerdos con bacteremia tras la provocación y *post mortem* no eran significativamente diferentes entre los dos grupos. Sin embargo, los cerdos vacunados presentaban una menor bacteremia (tabla 3).

- 15 2. *Infección post mortem*: se llevó a cabo el cultivo microbiológico de las muestras de cerebro, nódulo linfático traqueobronquial y articulaciones de todos los cerdos que habían sido retados, a fin de realizar un seguimiento del nivel de la infección. En la tabla 4 se muestra el número de tejidos de bacterias con morfología colonial típica de la cepa de provocación. La prueba de suma de rangos de Wilcoxon para el efecto del grupo vacunado sobre la puntuación bacteriológica media (media de la suma de puntuaciones para todos los tejidos de cada cerdo) demostró que dicha diferencia era significativa ($p=0,007$).

Patología (*post mortem*)

- 25 Se detectaron lesiones patológicas de artritis o neumonía en sólo 6 cerdos (2 en el grupo vacunado y 4 en el control). Otros cerdos muertos o eutanizados no presentaban signos patológicos gruesos. Una de las caracterizaciones de la infección por *S. suis* es que la infección aguda puede ser fatal sin signos gruesos apreciables de patología. El nódulo linfático traqueobronquial se encontraba agrandado. Se observó una cantidad menor de fibrina en el mesenterio, indicativa de peritonitis leve. Se observó evidencia de artritis en ambas articulaciones de rodilla posterior, en las que había una pequeña cantidad de material purulento, y en el hombro izquierdo, en el que se observó una cantidad menor de exudado purulento.

Respuesta de anticuerpos

- 35 La inmunización de cerdos con Sao en combinación con Quil A indujo respuestas humorales de IgG significativas tras la inmunización primaria y una inyección de refuerzo incrementó significativamente el título de anticuerpos (fig. 23). Además, aunque se indujeron ambas subclases, IgG1 e IgG2, el título de IgG2 dominaba sobre el de IgG1 según las mediciones en sueros 2 semanas después de la segunda vacunación (fig. 24).

40 Sumario y comentario

- Se ha demostrado que la vacuna es segura, ya que los cerdos que habían sido vacunados dos veces no mostraron ninguna reacción adversa. La inmunización de los cerdos con Sao en combinación con Quil A indujo títulos de IgG significativos con una producción dominante de IgG2, lo que sugiere una respuesta inmunitaria de tipo Th1 predominante. La provocación de aerosol de los cerdos resultó en enfermedad con una tasa de mortalidad global de aproximadamente 58% en los controles. La supervivencia de los cerdos vacunados fue significativamente superior que en los controles ($p<0,05$). Algunos cerdos en cada grupo enfermaron después de la provocación y se observó significativamente menos enfermedad (puntuación clínica más baja) en los cerdos vacunados. La vacunación no presentó ningún efecto significativo sobre la incidencia de patología gruesa *post mortem*; sin embargo, la septicemia estreptocócica aguda puede ser fatal sin signos gruesos apreciables de patología. Se recuperaron menos bacterias *S. suis* a partir de cerdos vacunados que los cerdos de control *post mortem* ($p<0,01$).

Ejemplo 5

- 55 Inmunización de ratones y lechones con el fragmento SP1A

Inmunización de ratones

- 60 Se inmunizaron tres grupos de 10 ratones dos veces (días 1 y 17) por vía i.p. con 40 µg de proteína de fusión SP1A-proteína de unión a maltosa (PUM) purificada, 20 µg de PUM o sólo PBS, utilizando como adyuvante, adyuvante incompleto de Freund. Se obtuvieron los sueros antes de cada inmunización o 10 días después de la segunda inyección y se diluyeron 1:5.000 para el ensayo de ELISA (ver la tabla 5).

Inmunización de cerdos

- 65 Se inmunizaron tres grupos de 3 cerdos dos veces (días 1 y 17) por vía i.m. con 200 µg de proteína de fusión

SP1A-PUM purificada, 100 µg de PUM o sólo PBS, utilizando Emulsigen como adyuvante. Se obtuvieron sueros antes de cada inmunización o 10 días después de la segunda inyección y se diluyeron 1:5.000 para el ensayo de ELISA (ver la tabla 6).

5 Tabla 1. Distribuciones de SP1 en cepas de referencia de *S. suis*, aislados de serotipo² y otros organismos detectados por el anticuerpo R44 específico de SP1 en transferencias western.

	Serotipo de <i>S. suis</i> (cepa de referencia)	Origen	SP1	Aislado de <i>S. suis</i> de serotipo 2	Origen	SP1	
1	(5428)	Países Bajos	+	89-999	Canadá	+	
1/2	(2651)	Países Bajos	+	90-1330	Canadá	+	
2	(NCTC 10234)	Países Bajos	+	95-8242	Canadá	+	
3	(4961)	Dinamarca	+	Man25	Canadá	+	
4	(6407)	Dinamarca	+	Man50	Canadá	+	
5	(11538)	Dinamarca	+	Man63	Canadá	+	
6	(2524)	Dinamarca	+	AAH4	EUA	+	
7	(8074)	Dinamarca	+	AAH5	EUA	+	
8	(14636)	Dinamarca	+	AAH6	EUA	+	
9	(22083)	Dinamarca	+	1309	EUA	+	
10	(4417)	Dinamarca	+	88-5955	EUA	+	
11	(12814)	Dinamarca	+	95-13626	EUA	+	
12	(8830)	Dinamarca	+	95-16426	EUA	+	
13	(10581)	Dinamarca	-	95-7220	EUA	+	
14	(13730)	Países Bajos	+	97-8506	EUA	+	
15	(NCTC 1046)	Países Bajos	+	SX-332	EUA	+	
16	(2726)	Dinamarca	-	JL590	México	+	
17	(93A)	Canadá	+	166	Francia	+	
18	(NT77)	Canadá	+	96-39247	Francia	+	
19	(42A)	Canadá	+	96-49808	Francia	+	
20	(86-5192)	EUA	-	96-53405	Francia	+	
21	(14A)	Canadá	+	Italie 57	Italia	+	
22	(88-1861)	Canadá	-	Italie 68	Italia	+	
23	(89-2479)	Canadá	+	Italie 69	Italia	-	
24	(88-5299A)	Canadá	-	Italie 228	Italia	+	
25	(89-3576-3)	Canadá	+	S735 ^a	Países Bajos	+	
26	(89-4109-1)	Canadá	+				
27	(89-5259)	Canadá	+				
28	(89-590)	Canadá	+	1	Organismo		
29	(92-1191)	Canadá	+	3	2 <i>S. bovis</i>	ATCC 9809	-
30	(92-1400)	Canadá	+	5	4 <i>S. equisimilis</i>	ATCC 9542	-
31	(92-4172)	Canadá	+	7	6 <i>S. intestinalis</i>	ATCC 43492	-
33	(EA1832.92)	Canadá	+	9	8 <i>S. pyogenes</i>	ATCC 14289	-
					10 <i>S. uberis</i>	ATCC 6580	-

^aCepa utilizada como referencia en el presente trabajo.

10 Tabla 2. Protección de cerdos tras la provocación con *S. suis* cepa 166

Grupos (n=8)	Cerdos artríticos	Cerdos bacteriémicos	Cerdos supervivientes
Emulsigen-Plus (Control)	6	3	5
Emulsigen-Plus + SP1	4	3	5

Tabla 3: Nivel de bacteremia de *S. suis*.

	Grupos		Significancia (p)
	Sao + Quil-A	Quil-A	
Antes de la provocación	ND (12)	ND (12)	N/A
3 días después de la provocación	1/11	2/12	0,6
Post mortem	1/11	4/9	0,13

15 Tabla 4: Nivel de infección post mortem.

Grupos	Cerebro	Nódulo linfático	Articulación	Puntuación bacteriológica media
--------	---------	------------------	--------------	---------------------------------

Sao + Quil-A	2/11	6/11	2/11	1,0
Quil-A	10/12	8/12	4/12	4,5

Tabla 5. Respuesta de IgG específica de SP1A en sueros de ratón (A450 nm)

Grupo	SP1A-PUM	PUM	PBS
Antes de la inmunización	0,006	0,016	0,0
Tras 1º inmunización	2,809	0,015	0,005
Tras 2º inmunización	3,153	0,015	0,004

5

Tabla 6. Respuesta de IgG específica de SP1A en cerdos (A450 nm)

Grupo	SP1A-PUM	PUM	PBS
Antes de la inmunización	0,024	0,018	0,024
Tras 1º inmunización	0,254	0,026	0,015
Tras 2º inmunización	0,501	0,047	0,033

Referencias

10 1. Arends, J. P., and H. C. Zanen. 1988. Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev Infect Dis* 10:131-7.

15 2. Arulanandam, B. P., J. M. Lynch, D. E. Briles, S. Hollingshead, and D. W. Metzger. 2001. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A and interleukin-12 augments antibody-mediated opsonization and protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* 69:6718-24.

20 3. Berthelot-Herault, F., R. Cariolet, A. Labbe, M. Gottschalk, J. Y. Cardinal, and M. Kobisch. 2001. Experimental infection of specific pathogen free piglets with French strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* 65:196-200.

4. Buchanan, R. M., D. E. Briles, B. P. Arulanandam, M. A. Westerink, R. H. Raeder, and D. W. Metzger. 2001. IL-12-mediated increases in protection elicited by pneumococcal and meningococcal conjugate vaccines. *Vaccine* 19:2020-8.

25 5. Burnette, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203.

30 6. Crawley, A., and B. N. Wilkie. 2003. Porcine Ig isotypes: function and molecular characteristics. *Vaccine* 21:2911-22.

35 7. Elliott, S. D., F. Clifton-Hadley, and J. Tai. 1980. Streptococcal infection in young pigs. V. An immunogenic polysaccharide from *Streptococcus suis* type 2 with particular reference to vaccination against streptococcal meningitis in pigs. *J Hyg (Lond)* 85:275-85.

8. Galina, L., U. Vecht, H. J. Wisselink, and C. Pijoan. 1996. Prevalence of various phenotypes of *Streptococcus suis* isolated from swine in the U.S.A. based on the presence of muramidase-released protein and extracellular factor. *Can J Vet Res* 60:72-4.

40 9. Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, M. Beaudoin, and J. Henrichsen. 1991. Characterization of six new capsular types (23 through 28) of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 29:2590-4.

45 10. Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, M. Beaudoin, and J. Henrichsen. 1991. Isolation and characterization of *Streptococcus suis* capsular types 9-22. *J Vet Diagn Invest* 3:60-5.

11. Gottschalk, M., R. Higgins, M. Jacques, K. R. Mittal, and J. Henrichsen. 1989. Description of 14 new capsular types of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 27:2633-6.

50 12. Gottschalk, M., A. Lebrun, H. Wisselink, J. D. Dubreuil, H. Smith, and U. Vecht. 1998. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* 62:75-9.

13. Gottschalk, M., and M. Segura. 2000. The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved questions. *Vet Microbiol* 76:259-72.

55 14. Higgins, R., and M. Gottschalk. 1998. Distribution of *Streptococcus suis* capsular types in 1997. *Can Vet J*

39:299-300.

- 5 15. Higgins, R., M. Gottschalk, M. Boudreau, A. Lebrun, and J. Henrichsen. 1995. Description of six new capsular types (29-34) of *Streptococcus suis*. *J Vet Diagn Invest* 7:405-6.
16. Higgins, R., M. Gottschalk. 2005. Streptococcal diseases (In press). In B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, and D. J. Taylor (9th ed), *Diseases of swine*. Iowa State University Press, Ames.
- 10 17. Hill, J. E., M. Gottschalk, R. Brousseau, J. Harel, S. M. Hemmingsen, and S. H. Goh. 2005. Biochemical analysis, cpn60 and 16S rADN sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*. *Vet Microbiol* 107:63-9.
- 15 18. Holt, M. E., M. R. Enright, and T. J. Alexander. 1988. Immunisation of pigs with live cultures of *Streptococcus suis* type 2. *Res Vet Sci* 45:349-52.
19. Ioannou, X. P., P. Griebel, R. Hecker, L. A. Babiuk, and S. van Drunen Littel-van den Hurk. 2002. The immunogenicity and protective efficacy of bovine herpesvirus 1 glycoprotein D plus Emulsigen are increased by formulation with CpG oligodeoxynucleotides. *J Virol* 76:9002-10.
- 20 20. Jacobs, A. A., A. J. van den Berg, and P. L. Loeffen. 1996. Protection of experimentally infected pigs by suliyisin, the thiol-activated haemolysin of *Streptococcus suis*. *Vet Rec* 139:225-8.
21. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- 25 22. Lefeber, D. J., B. Benaissa-Trouw, J. F. Vliegenthart, J. P. Kamerling, W. T. Jansen, K. Kraaijeveld, and H. Snippe. 2003. Th1-directing adjuvants increase the immunogenicity of oligosaccharide-protein conjugate vaccines related to *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Infect Immun* 71:6915-20.
- 30 23. Lofthouse, S. A., A. E. Andrews, A. D. Nash, and V. M. Bowles. 1995. Humoral and cellular responses induced by intradermally administered cytokine and conventional adjuvants. *Vaccine* 13:1131-7.
24. Lynch, J. M., D. E. Briles, and D. W. Metzger. 2003. Increased protection against pneumococcal disease by mucosal administration of conjugate vaccine plus interleukin-12. *Infect Immun* 71:4780-8.
- 35 25. Marques, M. B., D. L. Kasper, A. Shroff, F. Michon, H. J. Jennings, and M. R. Wessels. 1994. Functional activity of antibodies to the group B polysaccharide of group B streptococci elicited by a polysaccharide-protein conjugate vaccine. *Infect Immun* 62:1593-9.
- 40 26. McArthur, J., E. Medina, A. Mueller, J. Chin, B. J. Currie, K. S. Sriprakash, S. R. Talay, G. S. Chhatwal, and M. J. Walker. 2004. Intranasal vaccination with streptococcal fibronectin binding protein Sfb1 fails to prevent growth and dissemination of *Streptococcus pyogenes* in a murine skin infection model. *Infect Immun* 72:7342-5.
- 45 27. Miyaji, E. N., D. M. Ferreira, A. P. Lopes, M. C. Brandileone, W. O. Dias, and L. C. Leite. 2002. Analysis of serum cross-reactivity and cross-protection elicited by immunization with ADN vaccines against *Streptococcus pneumoniae* expressing PspA fragments from different clades. *Infect Immun* 70:5086-90.
- 50 28. Nichani, A. K., R. S. Kaushik, A. Mena, Y. Popowych, D. Dent, H. G. Townsend, G. Mutwiri, R. Hecker, L. A. Babiuk, and P. J. Griebel. 2004. CpG oligodeoxynucleotide induction of antiviral effector molecules in sheep. *Cell Immunol* 227:24-37.
- 55 29. Okwumabua, O., O. Abdelmagid, and M. M. Chengappa. 1999. Hybridization analysis of the gene encoding a hemolysin (suiyisin) of *Streptococcus suis* type 2: evidence for the absence of the gene in some isolates. *FEMS Microbiol Lett* 181:113-21.
30. Pallares, F. J., C. S. Schmitt, J. A. Roth, R. B. Evans, J. M. Kinyon, and P. G. Halbur. 2004. Evaluation of a ceftiofur-washed whole cell *Streptococcus suis* bacterin in pigs. *Can J Vet Res* 68:236-40.
- 60 31. Perch, B., K. B. Pedersen, and J. Henrichsen. 1983. Serology of capsulated streptococci pathogenic for pigs: six new serotypes of *Streptococcus suis*. *J Clin Microbiol* 17:993-6.
32. Segura, M., M. Gottschalk, and M. Olivier. 2004. Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis. *Infect Immun* 72:5322-30.
- 65 33. Serhir, B., D. Dugourd, M. Jacques, R. Higgins, and J. Harel. 1997. Cloning and characterization of a

- dextranase gene (dexS) from *Streptococcus suis*. *Gene* 190:257-61.
- 5 34. Sheoran, A. S., S. Artiushin, and J. F. Timoney. 2002. Nasal mucosal immunogenicity for the horse of a SeM peptide of *Streptococcus equi* genetically coupled to cholera toxin. *Vaccine* 20:1653-9.
35. Torremorell, M., C. Pijoan, and S. Dee. 1999. Experimental exposure of young pigs using a pathogenic strain of *Streptococcus suis* serotype 2 and evaluation of this method for disease prevention. *Can J Vet Res* 63:269-75.
- 10 36. Trottier, S., R. Higgins, G. Brochu, and M. Gottschalk. 1991. A case of human endocarditis due to *Streptococcus suis* in North America. *Rev Infect Dis* 13:1251-2.
37. Willson, P. J., A. Rossi-Campos, and A. A. Potter. 1995. Tissue reaction and immunity in swine immunized with *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccines. *Can J Vet Res* 59:299-305.
- 15 38. Wisselink, H. J., N. Stockhofe-Zurwieden, L. A. Hilgers, and H. E. Smith. 2002. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet Microbiol* 84:155-68.
- 20 39. Wisselink, H. J., U. Vecht, N. Stockhofe-Zurwieden, and H. E. Smith. 2001. Protection of pigs against challenge with virulent *Streptococcus suis* serotype 2 strains by a muramidase-released protein and extracellular factor vaccine. *Vet Rec* 148:473-7.
- 25 40. Wortham, C., L. Grinberg, D. C. Kaslow, D. E. Briles, L. S. McDaniel, A. Lees, M. Flora, C. M. Snapper, and J. J. Mond. 1998. Enhanced protective antibody responses to PspA after intranasal or subcutaneous injections of PspA genetically fused to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-2. *Infect Immun* 66:1513-20.
- 30 41. Yang, B., W. Zhu, L. B. Johnson, and F. F. White. 2000. The virulence factor AvrXa7 of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* is a type III secretion pathway-dependent nuclear-localized double-stranded ADN-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9807-12.
- 35 42. Pollack, M., N. L. Koles, M. J. Preston, B. J. Brown, and G. B. Pier. 1995. Functional properties of isotype-switched immunoglobulin M (IgM) and IgG monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 63:4481-8.
43. Unkeless, J. C., E. Scigliano, and V. H. Freedman. 1988. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* 6:251-81.
- 40 44. Serhir, B., D. Dugourd, M. Jacques, R. Higgins, and J. Harel. 1997. Cloning and characterization of a dextranase gene (dexS) from *Streptococcus suis*. *Gene* 190:257-61.
- 45 45. Okwumabua, O; Chinnapakkagari, S. 2005. Identification of the Gene Encoding a 38-Kilodalton Immunogenic and Protective Antigen of *Streptococcus suis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* Vol. 12, No.4: 484-490.

Listado de secuencias

5 <110> Université de Montréal
 Josée Harel
 Marcelo Gottschalk
 Yuanyi Li

10 <120> POLIPÉPTIDOS DE STREPTOCOCCUS SUIS Y POLINUCLEÓTIDOS CODIFICANTES DE LOS MISMOS Y
 UTILIZACIÓN EN APLICACIONES VACUNALES Y DIAGNÓSTICAS

<130> 000711-0079

15 <150> US 60/713.328
 <151> 2 de septiembre de 2005

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1
 <211> 670
 <212> PRT
 <213> Streptococcus suis

25 <400> 1

	Met	Asn	Thr	Lys	Lys	Trp	Arg	Thr	Ser	Leu	Leu	Ile	Pro	Gly	Ile
				5						10					15
	Val	Leu	Phe	Gly	Thr	Val	Ala	Leu	Val	Asn	Asn	Val	Ser	Ala	Gln
				20						25					30
	Glu	Val	Lys	Asn	Thr	Ile	Ile	Ser	Ala	Lys	Gln	Pro	Asp	Gly	Gly
				35						40					45
	Gln	Ala	Thr	Ser	Lys	Ala	Val	Asn	Val	Lys	Ile	Pro	Ala	Val	Val
				50						55					60

ES 2 581 981 T3

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

ES 2 581 981 T3

Gly	Gln	Leu	Val	Ser	Thr	Val	Thr	Tyr	Glu	Asn	Ser	Asp	Gln	Ile
				260					265					270
Phe	Glu	Asn	Ile	Leu	Asn	Pro	Gly	Lys	Leu	Ile	Ala	Pro	Thr	Thr
				275					280					285
Asp	Ser	Val	Ile	Thr	Asp	Asn	Glu	Val	Ser	Lys	Glu	Ala	Met	Ala
				290					295					300
Gly	Lys	Glu	Lys	Gly	Asn	Ile	Glu	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Ile	Ala
				305					310					315
Asn	Glu	Glu	Lys	Asp	Asn	Ile	Glu	Ala	Ser	Glu	Lys	Gln	Met	Pro
				320					325					330
Ser	Ile	Val	Asn	Asp	Met	Val	Val	Thr	Pro	Glu	Lys	Gln	Met	Thr
				335					340					345
Asn	Lys	Glu	Asn	Asp	Lys	Val	Val	Ile	Ser	Glu	Lys	Gln	Met	Pro
				350					355					360
Ser	Val	Val	Asn	Glu	Asn	Ala	Val	Thr	Pro	Glu	Lys	Gln	Met	Thr
				365					370					375
Asn	Lys	Glu	Asn	Asp	Asn	Ile	Glu	Thr	Ser	Glu	Lys	Gln	Met	Pro
				380					385					390
Ser	Val	Val	Asn	Glu	Asn	Ala	Val	Thr	Pro	Glu	Lys	Gln	Met	Thr
				395					400					405
Asn	Lys	Glu	Lys	Asp	Asn	Ile	Glu	Thr	Ser	Glu	Lys	Gln	Met	Pro
				410					415					420
Ser	Val	Val	Asn	Glu	Asn	Ala	Val	Thr	Pro	Glu	Lys	Gln	Met	Thr
				425					430					435
Asn	Lys	Glu	Lys	Asp	Asn	Ile	Glu	Thr	Ser	Glu	Lys	Gln	Met	Pro
				440					445					450

ES 2 581 981 T3

Ser Ile Val Asn Asp Met Val Val Thr	Pro Gln Glu Gln Met Ala
455	460 465
Asn Lys Glu Asn Asp Lys Val Val Ile	Ser Glu Lys Gln Met Pro
470	475 480
Ser Ile Val Asn Asp Met Val Val Thr	Pro Gln Glu Gln Met Ala
485	490 495
Asn Lys Glu Asn Asp Lys Val Val Ile	Ser Glu Lys Gln Met Pro
500	505 510
Ser Ile Val Asn Asp Met Val Val Thr	Pro Gln Glu Gln Met Ala
515	520 525
Asn Lys Glu Asn Asp Lys Val Val Ile	Ser Glu Lys Gln Met Pro
530	535 540
Ser Ile Val Asn Asp Met Val Val Thr	Pro Gln Glu Gln Met Ala
545	550 555
Asn Lys Glu Asn Asp Lys Val Glu Thr	Ser Glu Lys Gln Met Pro
560	565 570
Val Asn Glu Lys Asp Asn Ala Val Thr	Pro Glu Lys Gln Met Ala
575	580 585
Asn Lys Glu Lys Glu Asn Ile Glu Thr	Ser Lys Lys Gln Ile Pro
590	595 600
Val Asn Glu Asn Asn Gln Asn Gly Thr	Val Glu Glu Asn Ser Asn
605	610 615
Thr Lys Pro Thr Thr Glu Lys Thr Asp	Lys Gln Glu Thr Ser Thr
620	625 630
Phe Lys Thr Glu Thr Ala Lys Gln Ile	Leu Pro Val Thr Gly Glu
635	640 645

ES 2 581 981 T3

Lys Gly Ser Leu Trp Leu Leu Thr Ser Gly Ile Ile Gly Leu Ala
 650 655 660

Ile Ala Leu Phe Thr Arg Lys Arg Lys Leu
 665 670

<210> 2
 <211> 580
 5 <212> PRT
 <213> Streptococcus suis

<400> 2
 Met Asn Thr Lys Lys Trp Arg Thr Ser Leu Leu Ile Pro Gly Ile
 5 10 15

Val Leu Phe Gly Thr Val Ala Leu Val Asn Asn Val Ser Ala Gln
 20 25 30

Glu Val Lys Asn Thr Ile Ile Ser Ala Lys Gln Pro Asp Gly Gly
 35 40 45

Gln Ala Thr Ser Lys Ala Val Asn Val Lys Ile Pro Ala Val Val
 50 55 60

Arg Leu Phe Gly Arg Glu Leu Leu Glu Asn Glu Phe Lys Phe Glu
 65 70 75

Leu Arg Glu Ala Asn Gly Glu Glu Leu Pro Val Leu Asp Thr Ala
 80 85 90

Gln Asn Thr Lys Glu Gly Gln Val Arg Phe Lys Asn Leu Ser Phe
 95 100 105

Asp Lys Pro Gly Lys Tyr Trp Tyr Thr Ile Ser Glu Val Lys Asp
 110 115 120

ES 2 581 981 T3

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

ES 2 581 981 T3

Asn	Glu	Glu	Lys	Asp	Asn	Ile	Glu	Ala	Ser	Glu	Lys	Gln	Met	Pro
				320					325					330
Ser	Val	Val	Asn	Glu	Asn	Ala	Val	Thr	Pro	Glu	Lys	Gln	Met	Thr
				335					340					345
Asn	Lys	Glu	Lys	Asp	Asn	Ile	Glu	Thr	Ser	Glu	Lys	Gln	Met	Pro
				350					355					360
Ser	Ile	Val	Asn	Asp	Met	Val	Val	Thr	Pro	Gln	Glu	Gln	Met	Ala
				365					370					375
Asn	Lys	Glu	Asn	Asp	Lys	Val	Val	Ile	Ser	Glu	Lys	Gln	Met	Pro
				380					385					390
Ser	Ile	Val	Asn	Asp	Met	Val	Val	Thr	Pro	Gln	Glu	Gln	Met	Ala
				395					400					405
Asn	Lys	Glu	Asn	Asp	Lys	Val	Val	Ile	Ser	Glu	Lys	Gln	Met	Pro
				410					415					420
Ser	Ile	Val	Asn	Asp	Met	Val	Val	Thr	Pro	Gln	Glu	Gln	Met	Ala
				425					430					435
Asn	Lys	Glu	Asn	Asp	Lys	Val	Val	Ile	Ser	Glu	Lys	Gln	Met	Pro
				440					445					450
Ser	Ile	Val	Asn	Asp	Met	Val	Val	Thr	Pro	Gln	Glu	Gln	Met	Ala
				455					460					465
Asn	Lys	Glu	Asn	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Ser	Glu	Lys	Gln	Met	Pro
				470					475					480
Val	Asn	Glu	Lys	Asp	Asn	Ala	Val	Thr	Pro	Glu	Lys	Gln	Met	Ala
				485					490					495
Asn	Lys	Glu	Lys	Glu	Asn	Ile	Glu	Thr	Ser	Lys	Lys	Gln	Ile	Pro
				500					505					510

ES 2 581 981 T3

Val Asn Glu Asn Asn Gln Asn Gly Thr Val Glu Glu Asn Ser Asn
 515 520 525

Thr Lys Pro Thr Thr Glu Lys Thr Asp Lys Gln Glu Thr Ser Thr
 530 535 540

Phe Lys Thr Glu Thr Ala Lys Gln Ile Leu Pro Val Thr Gly Glu
 545 550 555

Lys Gly Ser Leu Trp Leu Leu Thr Ser Gly Ile Ile Gly Leu Ala
 560 565 570

Ile Ala Leu Phe Thr Arg Lys Arg Lys Leu
 575 580

<210> 3

<211> 520

5 <212> PRT

<213> Streptococcus suis

<400> 3

Met Asn Thr Lys Lys Trp Arg Thr Ser Leu Leu Ile Pro Gly Ile
 5 10 15

Val Leu Phe Gly Thr Val Ala Leu Val Asn Asn Val Ser Ala Gln
 20 25 30

Glu Val Lys Asn Thr Ile Ile Ser Ala Lys Gln Pro Asp Gly Gly
 35 40 45

Gln Ala Thr Ser Lys Ala Val Asn Val Lys Ile Pro Ala Val Val
 50 55 60

Arg Leu Phe Gly Arg Glu Leu Leu Glu Asn Glu Phe Lys Phe Glu
 65 70 75

ES 2 581 981 T3

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

ES 2 581 981 T3

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

ES 2 581 981 T3

Thr Lys Pro Thr Thr Glu Lys Thr Asp Lys Gln Glu Thr Ser Thr
 470 475 480

Phe Lys Thr Glu Thr Ala Lys Gln Ile Leu Pro Val Thr Gly Glu
 485 490 495

Lys Gly Ser Leu Trp Leu Leu Thr Ser Gly Ile Ile Gly Leu Ala
 500 505 510

Ile Ala Leu Phe Thr Arg Lys Arg Lys Leu
 515 520

<210> 4
 <211> 315
 <212> PRT
 <213> Streptococcus suis

5

<400> 4

Ser Ala Gln Glu Val Lys Asn Thr Ile Ile Ser Ala Lys Gln Pro
 5 10 15

Asp Gly Gly Gln Ala Thr Ser Lys Ala Val Asn Val Lys Ile Pro
 20 25 30

Ala Val Val Arg Leu Phe Gly Arg Glu Leu Leu Glu Asn Glu Phe
 35 40 45

Lys Phe Glu Leu Arg Glu Ala Asn Gly Glu Glu Leu Pro Val Leu
 50 55 60

Asp Thr Ala Gln Asn Thr Lys Glu Gly Gln Val Arg Phe Lys Asn
 65 70 75

Leu Ser Phe Asp Lys Pro Gly Lys Tyr Trp Tyr Thr Ile Ser Glu
 80 85 90

10

ES 2 581 981 T3

Val Lys Asp Glu Leu Gly Gly Ile Glu Tyr Asp Ser Lys Tyr Ile
 95 100 105

Val Ala Lys Ile Thr Val Glu Asp Arg Asn Gly Gln Leu Gln Ala
 110 115 120

Met Ile Glu Phe Ile Asp Asn Asp Asn Val Phe Asn Asn Phe Tyr
 125 130 135

Thr Pro Ala Pro Ala Ala Ala Ser Leu Ser Ile Lys Lys Val Leu
 140 145 150

Glu Gly Arg Thr Leu Asn Thr Gly Glu Phe Glu Phe Val Leu Lys
 155 160 165

Asn Glu Lys Gly Asp Glu Ile Glu Lys Val Ser Asn Gln Ala Asp
 170 175 180

Gly Ser Val Asn Phe Ser Ala Leu Thr Phe Thr Lys Glu Gly Thr
 185 190 195

Tyr Thr Tyr Thr Val Ser Glu Val Asp Gly Gly Leu Gly Asp Ile
 200 205 210

Ile Tyr Asp Lys Ser Asp Ile Lys Ala Thr Val Thr Val Lys Asp
 215 220 225

Asn Asn His Gly Gln Leu Val Ser Thr Val Thr Tyr Glu Asn Ser
 230 235 240

Asp Gln Ile Phe Glu Asn Ile Leu Asn Pro Gly Lys Leu Ile Ala
 245 250 255

Pro Thr Thr Asp Ser Val Ile Thr Asp Asn Glu Val Ser Lys Glu
 260 265 270

Ala Met Ala Gly Lys Glu Lys Gly Asn Ile Glu Pro Pro Lys Glu
 275 280 285

ES 2 581 981 T3

Gln Ile Ala Asn Glu Glu Lys Asp Asn Ile Glu Ala Ser Glu Lys
 290 295 300

Gln Met Pro Ser Ile Val Asn Asp Met Val Val Thr Pro Glu Lys
 305 310 315

<210> 5
 <211> 2013
 <212> ADN
 <213> Streptococcus suis

5

<400> 5
 atgaatacta agaaatggag aacatcgctc ctaataccag gaatagtatt atttggaaact 60
 gttgctctag tgaataatgt atcggcaciaa gaagtaaaaa ataccatcat cagcgcaaaa 120
 caacctgatg ggggacaggc tacttcaaag gcggttaatg tcaaaatacc agcagtagta 180
 cgactatctg gtcgtgagct tctagaaaat gaatttaaat ttgagcttag agaagcgaat 240
 ggcgaggaac tcctgtcct tgatacagct caaaatacaa aagagggca agttagattt 300
 aaaaatctat cattcgataa gcctggcaaa tactgggtata caatttcaga agtaaaagat 360
 gagcttggtg gtattgagta tgattcgaaa tatattgtag caaaaataac tgtagaagat 420
~~cgaaacgggc aattacaggc aatgatcgaa tttattgata atgacaatgt cttaacaat 480~~
 ttctatacac ctgctccagc tgctgctagt ctttcgataa aaaaagtcc ctagggagct 540
 accttaaca cgggtgaatt cgaatttgtt ttaaaaaatg aaaaaggcga tgaatcgaa 600
 aaggtaagca atcaagcaga tggttctgta aactttagt cctaaccatt taaaaagag 660
 ggaacctata cctacactgt ttcagaagtt gatggtggac ttggcgatat tatctatgac 720
 aatcagata ttaaggccac tgttactgtg aaagataaca atcacggaca actagtctca 780
 acagtgactt atgaaaatag cgatcaaatc ttcgagaata ttttgaatcc tgggaagtta 840
 atagcgcaa ccacggatag cgttattact gataatgaag tctctaagga agcaatggcc 900
 ggtaaagaga agggaaatat cgaacccct aaagagcaaa tagctaataga agagaaggat 960
 aatattgaag cctctgaaaa acagatgcca agcattgtga acgacatggt cgtaacacct 1020
 gaaaagcaaa tgactaataa agagaacgat aaggttgtaa tctctgaaaa acaaatgccg 1080
 agtgttgtga acgaaaatgc cgtaacacct gaaaagcaaa tgactaataa agagaacgat 1140
 aatattgaaa cctctgaaaa acagatgccg agtgttgtga acgaaaatgc cgtaacacct 1200
 gaaaagcaaa tgactaataa agagaaggat aatattgaaa cctctgaaaa acagatgccg 1260
 agtgttgtga acgaaaatgc cgtaacacct gaaaagcaaa tgactaataa agagaaggat 1320
 aatattgaaa cctctgaaaa acaaatgcca agcattgtga acgacatggt cgtaacacct 1380
 caagaacaaa tggctaataa agagaacgat aaggttgtaa tctctgaaaa acagatgcca 1440
 agcattgtga acgacatggt cgtaacacct caagaacaaa tggctaataa agagaacgat 1500

ES 2 581 981 T3

aaggttgtaa tctctgaaaa acagatgcca agcattgtga acgacatggt cgtaacacct 1560
 caagaacaaa tggctaataa agagaacgat aaggttgtaa tctctgaaaa acagatgcca 1620
 agcattgtga acgacatggt cgtaacacct caagaacaaa tggctaataa agagaacgat 1680
 aaggttgaaa cctctgaaaa acagatgcct gttaatgaga aggacaatgc cgtaacacct 1740
 gaaaagcaaa tggctaataa agagaaggaa aatatacgaaa cctctaataa acagataacct 1800
 gttaatgaga acaacacaaa tggtagcgtc gaagaaaatt caaacactaa accaacaact 1860
 gaaaaaacag acaagcagga gacttcaaca tttaaaaccg aaactgctaa gcaaatctta 1920
 ccagtaactg gtgagaaagg aagtttatgg ttattgacaa gtggtattat cgggcttgca 1980
 attgcgttat ttacacgtaa acgtaaatta taa 2013

<210> 6
 <211> 1742
 <212> ADN
 <213> Streptococcus suis

5

<400> 6
 atgaatacta agaaatggag aacatcgctc ctaataccag gaatagtatt atttggaaact 60
 gttgctctag tgaataatgt atcggcacia gaagtaaaaa ataccatcat cagcgcacaaa 120
 caacctgatg ggggacaggg tacttcaaag gcgggttaatg tcaaaaatacc agcagtagta 180
 cgactatttg gtcgtgagct tctagaaaaat gaatttaaat ttgagcttag agaagcgaat 240
 ggcgaggaac tccctgtcct tgatacagct caaaatacaa aagaggggtca agttagattt 300
 aaaaatctat cattcgataa gcctggcaaa tactgggtata caatttcaga agtaaaagat 360
 gagcttggtg gtattgagta tgattcgaaa tatattgtag caaaaataac tgtagaagat 420
 cgaaacgggc aattacaggc aatgatcgaa tttattgata atgacaatgt ctttaacaat 480
 ttctatacac ctgctccagc tgctgctagt ctttcgataa aaaaagtcct cgagggacgt 540
 accttaaaca cgggtgaatt cgaatttgtt ttaaaaaatg aaaaaggcga tgaatcgaa 600
 aagtaagca atcaagcaga tggttctgta aactttagt cccaaacatt tacaaaagag 660
 ggaacctata cctacactgt ttcagaagtt gatgggtggac ttggcgatat tatctatgac 720
 aatcagata ttaaggccac tgttactgtg aaagataaca atcacggaca actagtctca 780
 acagtgactt atgaaaatag cgatcaaac ttcagagaata ttttgaaatc tgggaagtta 840
 atagcgccaa ccacggatag cgttattact gataatgaag tctctaagga agcaatggcc 900
 ggtaaaagaga agggaaatat cgaaccccc aaagagcaaa tagctaataga agagaaggat 960
 aatattgaag cctctgaaaa acagatgccg agtggtgtga acgaaaatgc cgtaacacct 1020
 gaaaagcaaa tgactaataa agagaaggat aatattgaaa cctctgaaaa acaaatgcca 1080
 agcattgtga acgacatggt cgtaacacct caagaacaaa tggctaataa agagaacgat 1140
 aaggttgtaa tctctgaaaa acagatgcca agcattgtga acgacatggt cgtaacacct 1200
 caagaacaaa tggctaataa agagaacgat aaggttgtaa tctctgaaaa acagatgcca 1260
 agcattgtga acgacatggt cgtaacacct cagaacaaat ggctaataaa gagaacgata 1320
 aggttgtaat ctctgaaaaa cagatgcca gcattgtgaa cgacatggtc gtaacacctc 1380
 aagaacaaat ggctaataaa gagaacgata aggttgaaac ctctgaaaaa cagatgcctg 1440
 ttaatgagaa ggacaatgcc gtaacacctg aaaagcaaat ggctaataaa gagaaggaaa 1500
 atatcgaaac ctctaaaaaa cagatacctg ttaatgagaa caacaaaat ggtacagtcg 1560
 aagaaaattc aaacactaaa ccaacaactg aaaaaacaga caagcaggag acttcaacat 1620
 ttaaaaaccg aactgctaag caaatcttac cagtaactgg tgagaaagga agtttatggg 1680
 tattgacaag tggattatc gggcttgcaa ttgcgttatt tacacgtaaa cgtaaattat 1740
 aa 1742

10

<210> 7

ES 2 581 981 T3

<211> 1563
 <212> ADN
 <213> Streptococcus suis

5 <400> 7
 atgaatacta agaaatggag aacatcgctc ctaataccag gaatagtatt atttggaaact 60
 gttgctctag tgaataatgt atcggcacia gaagtaaaaa ataccatcat cagcgcaaaa 120
 caacctgatg ggggacaggc tacttcaaag ggggttaatg tcaaaatacc agcagtagta 180
 cgactatttg gtcgtgagct tctagaaaat gaatttaaatt ttgagcttag agaagcgaat 240
~~ggcgagggaac tccctgtcct tgatacagct caaaatacaa aagaggggtca agttagattt~~ 300
 aaaaatctat cattcgataa gcctggcaaa tactgggtata caatttcaga agtaaaagat 360
 gagcttgggtg gtattgagta tgattcgaaa tatattgtag caaaaataac tgtagaagat 420
 cgaaacgggc aattacaggc aatgatcgaa tttattgata atgacaatgt ctttaacaat 480
 ttctatacac ctgctccagc tgctgctagt ctttcgataa aaaaagtcct cgagggacgt 540
 accttaaca cgggtgaatt cgaatttggt ttaaaaaatg aaaaaggcga tgaaatcgaa 600
 aaggtaagca atcaagcaga tggttctgta aactttagtg ccctaacatt tacaaaagag 660
 ggaacctata cctacactgt ttcagaagtt gatgggtggac ttggcgatat tatctatgac 720
 aatcagata ttaaggccac tgttactgtg aaagataaca atcacggaca actagtctca 780
 acagtgactt atgaaaatag cgatcaaatc ttcgagaata ttttgaatcc tgggaagtta 840
 atagcgccaa ccacggatag cgttattact gataatgaag tctctaagga agcaatggcc 900
 ggtaaagaga agggaaatat cgaaccccct aaagagcaaa tagctaataga agagaaggat 960
 aatattgaag cctctgaaaa acagatgcca agcattgtga acgacatggt cgtaacacct 1020
 gaaaagcaaa tgactaataa agagaacgat aaggttgtaa tctctgaaaa acaaatgccg 1080
 agtgttgtga acgaaaatgc cgtaacacct gaaaagcaaa tgactaataa agagaacgat 1140
 aatattgaaa cctctgaaaa acagatgccg agtgttgtga acgaaaatgc cgtaacacct 1200
 gaaaagcaaa tgactaataa agagaaggat aatattgaaa cctctgaaaa acagatgccg 1260
 agtgttgtga acgaaaatgc cgtaacacct gaaaagcaaa tgactaataa agagaaggat 1320
 aatattgaaa cctctgaaaa acaataacct gttaatgaga acaaccaaaa tggtagcagtc 1380
 gaagaaaatt caaacactaa accaacaact gaaaaaacag acaagcagga gacttcaaca 1440
 tttaaaaccg aaactgctaa gcaaatctta ccagtaactg gtgagaaagg aagtttatgg 1500
 ttattgacaa gtgggtattat cgggcttgca attgcgttat ttacacgtaa acgtaaatta 1560
 taa 1563

10 <210> 8
 <211> 945
 <212> ADN
 <213> Streptococcus suis

<400> 8

ES 2 581 981 T3

tcggcacaag aagtaaaaaa taccatcatc agcgcaaaac aacctgatgg gggacaggct 60
acttcaaagg cggttaatgt caaaatacca gcagtagtac gactatttgg tctgagctt 120
ctagaaaatg aatttaaatt tgagcttaga gaagcgaatg gcgaggaact ccctgtcctt 180
gatacagctc aaaatacaaa agaggggtcaa gttagattta aaaatctatc attcgataag 240
cctggcaaat actggtatac aatttcagaa gtaaaagatg agcttggtgg tattgagtat 300
gattcgaaat atattgtagc aaaaataact gtagaagatc gaaacgggca attacaggca 360
atgatcgaat ttattgataa tgacaatgtc ttaacaatt tctatacacc tgctccagct 420
gctgctagtc tttcgataaa aaaagtcctc gagggacgta--ccttaaacac--cgggtaattc ---480
gaatttgttt taaaaaatga aaaaggcgtat gaaatcgaaa aggtaagcaa tcaagcagat 540
ggttctgtaa acttttagtc cctaacattt acaaaagagg gaacctatac ctacactgtt 600
tcagaagtgg atgggtggact tggcgatatt atctatgaca aatcagatat taaggccact 660
gttactgtga aagataacaa tcacggacaa ctagtctcaa cagtgactta tgaaaatagc 720
gatcaaatct tcgagaatat tttgaatcct ggggaagttaa tagcgccaac cacggatagc 780
gttattactg ataatgaagt ctctaaggaa gcaatggccg gtaaagagaa gggaaatatac 840
gaacccccta aagagcaaat agctaataaa gagaaggata atattgaagc ctctgaaaaa 900
cagatgccaa gcattgtgaa cgacatggtc gtaacacctg aaaag 945

- <210> 9
- <211> 30
- 5 <212> PRT
- <213> Streptococcus suis

- <220>
- <221> SITIO
- 10 <222> (1)
- <223> Xaa es Val, Thr o Ile

- <220>
- <221> SITIO
- 15 <222> (3)
- <223> Xaa es Lys o Glu

- <220>
- <221> SITIO
- 20 <222> (4)
- <223> Xaa es Lys o Glu

- <220>
- <221> SITIO
- 25 <222> (5)
- <223> Xaa es Ala o Gln

- <220>
- <221> SITIO
- 30 <222> (7)
- <223> Xaa es Thr o Pro

- <220>
- <221> SITIO
- 35 <222> (8)
- <223> Xaa es Gly, Ser o Val

- <220>
- <221> SITIO
- 40 <222> (9)
- <223> Xaa es Lys, Val, Ile o Asn

- <220>

- <221> SITIO
- <222> (10)
- <223> Xaa es Glu o Val

- 5 <220>
- <221> SITIO
- <222> (11)
- <223> Xaa es Lys o Asn

- 10 <220>
- <221> SITIO
- <222> (12)
- <223> Xaa es Gly, Glu o Asp

- 15 <220>
- <221> SITIO
- <222> (13)
- <223> Xaa es Asn o Met

- 20 <220>
- <221> SITIO
- <222> (14)
- <223> Xaa es Ile, Ala o Val

- 25 <220>
- <221> SITIO
- <222> (15)
- <223> Xaa es Glu o Val

- 30 <220>
- <221> SITIO
- <222> (16)
- <223> Xaa es Pro o Thr

- 35 <220>
- <221> SITIO
- <222> (18)
- <223> Xaa es Glu o Gln

- 40 <220>
- <221> SITIO
- <222> (19)
- <223> Xaa es Lys o Glu

- 45 <220>
- <221> SITIO
- <222> (22)
- <223> Xaa es Thr o Ala

- 50 <220>
- <221> SITIO
- <222> (26)
- <223> Xaa es Lys o Asn

- 55 <220>
- <221> SITIO
- <222> (27)
- <223> Xaa es Asp o Glu

- 60 <220>
- <221> SITIO
- <222> (28)
- <223> Xaa es Asn o Lys

- 65 <220>
- <221> SITIO

ES 2 581 981 T3

<222> (29)
<223> Xaa es Ile o Val

5 <220>
<221> SITIO
<222> (30)
<223> Xaa es Glu o Val

<400> 9
Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Met Xaa
5 10 15

10 Xaa Pro Xaa Xaa Gln Met Xaa Asn Lys Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
15 <213> Streptococcus suis

<400> 10
Leu Pro Val Thr Gly
1 5

20 <210> 11
<211> 386
<212> PRT
<213> Streptococcus suis

25 <400> 11

ES 2 581 981 T3

Met Lys Arg Lys Arg Thr Asn Lys Pro Gln His Met Arg Arg Lys
 5 10 15

Arg Lys Thr Pro Ile Met Lys Asn Asn Lys Lys Met Leu Tyr Thr
 20 25 30

~~Ser Ser Leu Ala Leu Ser Leu Phe Ser Thr Gly Met Ile Ser Thr~~
 35 40 45

Asn Val Leu Ala Ile Glu Trp Ala Pro Arg Thr Val Ser Glu Ile
 50 55 60

Ser Pro Glu Ile Val Gln Glu Glu Gly Arg Met Thr Tyr Thr Val
 65 70 75

Gln Tyr Gly Asp Thr Leu Ser Ala Ile Ala Ser Ala Met Asn Ile
 80 85 90

Asp Met Asp Leu Leu Ala Lys Ile Asn Gln Ile Ala Asp Val Asn
 95 100 105

Leu Ile Phe Pro Asp Thr Val Leu Thr Thr Thr Val Asp Gln Asn
 110 115 120

ES 2 581 981 T3

Asn Gln Val Thr Gln Val Glu Ile Glu Ala Pro Val Gln Gly Asn
 125 130 135

Thr Asn Glu Thr Val Gln Ala Thr Val Asp Leu Thr Thr Asn Gln
 140 145 150

Val Thr Val Glu Asp Thr Val Val Pro Leu Asp Gln Ile Ser Ser
 155 160 165

Val Thr Asp Ser Ala Pro Val Glu Glu Val Val Glu Gln Pro Val
 170 175 180

Ala Glu Ala Pro Val Glu Glu Val Val Glu Gln Pro Val Val Glu
 185 190 195

Ala Pro Val Glu Glu Val Val Glu Gln Pro Val Val Glu Ala Pro
 200 205 210

Val Glu Glu Val Ala Glu Gln Pro Val Val Glu Ala Pro Val Glu
 215 220 225

~~Glu Val Val Glu Gln Pro Val Val Glu Ala Pro Val Glu Glu Val~~
 230 235 240

Ala Glu Gln Pro Val Val Glu Ala Pro Val Glu Gln Pro Val Val
 245 250 255

Glu Thr Pro Gln Val Thr Ala Leu Ser Thr Thr Thr Thr Ser Thr
 260 265 270

Ser Ala Tyr Asp Val Gly Leu Gln Pro Gln Val Ala Ala Phe Arg
 275 280 285

Ala Glu Val Ala Asn Ala Phe Gly Ile Thr Ser Phe Ser Gly Tyr
 290 295 300

Arg Pro Gly Asp Ser Gly Asp His Gly Lys Gly Leu Ala Ile Asp
 305 310 315

ES 2 581 981 T3

Phe Met Val Pro Glu Ser Ser Ala Leu Gly Asp Gln Val Ala Ala
 320 325 330

Tyr Ala Val Ala Asn Leu Ala Ser Lys Asn Ile Asn Tyr Ile Ile
 335 340 345

Trp Lys Gln Arg Phe Tyr Ala Pro Tyr Asp Ser Ile Tyr Gly Pro
 350 355 360

Ala Tyr Thr Trp Asn Leu Met Pro Asp Arg Gly Ser Ile Thr Glu
 365 370 375

Asn His Tyr Asp His Val His Val Ser Phe Asn
 380 385

<210> 12
 <211> 1161
 <212> ADN
 <213> Streptococcus suis

5

<400> 12
 atgaaaacgta agagaacaaa taaaccacaa catatgcgctc gcaagagaaa aacacctatc 60
 atgaaaaaca ataagaagat gttatacaca tcttcattgg ctctttccct ctttagtaca 120
 gggatgattt cgacaaatgt tttagccatc gaatgggctc cacgtactgt ttctgaaatt 180
 agcccagaaa ttgtacaaga agaaggaagg atgacctata ctgttcagta tggagatacc 240
 ttatctgcca tcgcctcagc tatgaatatt gatatggact tgctggcgaa aataaatcaa 300
 attgcagatg tcaacttgat tttccctgat acggctactga cgacgactgt tgaccaaac 360
 aatcaagtga ctcaggttga gattgaagct cctgttcagg gaaacacaaa tgagaccggt 420
 caggcaactg ttgacctaac aaccaatcaa gtaacggttg aggatacggg tgttcccttg 480
 gatcaaattt catcagttac cgactcagcg cccgtagagg aagttgtaga acagcctgta 540
 gcagaagcac ctgtagagga agttgtagaa caacctgtag tagaagcgcc cgtagaggaa 600
 gttgtagaac agcctgtagt agaagcacct gtagaggaag ttgcagaaca cctgtgggtg 660
 aggcaacctg tagaggaagt ggtggagcaa cctgtgggtg aggcacctgt agaggaagtt 720
 gcagaacaac ctgtagtaga agcacctgta gaacagcctg tagttgaaac tccacaagtg 780
 acagccctat caactactac aacaagtaca agtgcttatg atgtcggttt gcaacctcag 840
 gtagcagcct tccgcgcaga agtagctaat gccttcggta ttacttcttt ctcaggttac 900
 cgtcctgggtg attctggcga ccatggtaag ggattggcaa ttgactttat ggtgcctgag 960
 agctcagctc taggagatca agtggcagct tatgcagttg caaacttagc ttctaaaaat 1020
 atcaactaca tcatttgga acagcgcttc tatkcgcctg atgacagtat ctatggcca 1080
 gcctatacat ggaatctgat gccagaccgt ggtagcatta cagaaaacca ctacgatcat 1140
 gtgcatgtat cttttaatta g 1161

10

<210> 13
 <211> 38
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido
 5 <400> 13
 atggatccat tgaagccgc tcggcacaag aagtaaaa 38
 <210> 14
 10 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador oligonucleótido
 <400> 14
 ccaagtcgac ttataatta cgtttacgtg ta 32
 <210> 15
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Cebador oligonucleótido
 <400> 15
 30 tttaaagaa cggttgaagg c 21
 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido
 <400> 16
 40 gcataagctg ccacttgatc t 21

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido SP1 aislado que puede provocar una respuesta inmunitaria específica a *Streptococcus suis* que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 95% respecto a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº 4 o 17.
2. Polipéptido SP1 aislado según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº 10.
- 10 3. Polipéptido SP1 aislado según la reivindicación 1 o 2, que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 95% respecto a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº 17.
- 15 4. Polipéptido SP1 aislado según las reivindicaciones 1 a 2, que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de por lo menos 95% respecto a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº 4.
5. Polipéptido SP1 aislado según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº 17.
- 20 6. Polipéptido SP1 aislado según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº 4.
7. Polipéptido SP1 aislado que puede inducir una respuesta inmunitaria específica a *Streptococcus suis*, que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº 2 o 3.
- 25 8. Polipéptido SP1 aislado según la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº 17.
9. Polipéptido SP1 aislado según la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº 4.
- 30 10. Polipéptido SP1 aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que provoca una respuesta protectora a una provocación de cepa de *Streptococcus suis* cuando es administrado en un animal.
- 35 11. Polinucleótido SP1 aislado codificante de un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Polinucleótido SP1 aislado según la reivindicación 11, en el que la secuencia polinucleotídica presenta una identidad de 95% respecto a la secuencia expuesta en SEC ID nº 18.
- 40 13. Polinucleótido SP1 aislado según la reivindicación 11, en el que la secuencia polinucleotídica presenta una identidad de 95% respecto a la secuencia expuesta en SEC ID nº 8.
14. Polinucleótido SP1 aislado según la reivindicación 11, que comprende la secuencia expuesta en SEC ID nº 18.
- 45 15. Polinucleótido SP1 aislado según la reivindicación 11, que comprende la secuencia polinucleotídica expuesta en SEC ID nº 8.
16. Anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido SP1 que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID nº 4 o en SEC ID nº 17.
- 50 17. Vector que comprende el polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15.
18. Composición que comprende un vehículo aceptable y por lo menos uno de:
 - 55 - un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;
 - un polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15; o
 - un vector como se define en la reivindicación 17.
- 60 19. Composición que comprende un vehículo aceptable y por lo menos un anticuerpo como se define en la reivindicación 16.
- 65 20. Procedimiento para preparar una composición como se define en la reivindicación 19 para prevenir las enfermedades asociadas a *Streptococcus suis* o la infección causada por *S. suis*, que comprende la etapa de mezclar por lo menos un anticuerpo como se define en la reivindicación 16 con por lo menos un vehículo aceptable

en el que dicho por lo menos un anticuerpo resulta de una vacunación con un adyuvante que dirige a Th-1.

21. Procedimiento para preparar una composición para la utilización en la prevención de una enfermedad o infección asociada a *Streptococcus suis* en un animal, comprendiendo el procedimiento la etapa de mezclar por lo menos uno de:

- un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;
- un polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15;
- un vector como se define en la reivindicación 17,

con por lo menos un vehículo aceptable y un adyuvante que dirige a Th1.

22. Composición que consiste en un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un adyuvante que dirige a Th1; un polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 y un adyuvante que dirige a Th1; un vector de expresión como se define en la reivindicación 17 y un adyuvante que dirige a Th1; o una composición como se define en la reivindicación 18 y un adyuvante que dirige a Th1; para la utilización como un medicamento o como una vacuna.

23. Composición que consiste en un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un adyuvante que dirige a Th1; un polinucleótido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 y un adyuvante que dirige a Th1; un vector de expresión como se define en la reivindicación 17 y un adyuvante que dirige a Th1; o una composición como se define en la reivindicación 18 y un adyuvante que dirige a Th1; para la utilización en la prevención de una enfermedad o infección asociada a *Streptococcus suis* en un animal.

24. Anticuerpo como se define en la reivindicación 16 o composición como se define en la reivindicación 19, para la utilización como un medicamento en el que dicho por lo menos un anticuerpo resulta de una vacunación con un adyuvante que dirige a Th-1.

25. Anticuerpo como se define en la reivindicación 16 o composición como se define en la reivindicación 19, para la utilización en la prevención de una enfermedad o infección asociada a *Streptococcus suis* en un medicamento de animales en el que dicho por lo menos un anticuerpo resulta de una vacunación con un adyuvante que dirige a Th-1.

26. Procedimiento para detectar *in vitro* la presencia o la ausencia de una cepa de *Streptococcus suis* en una muestra, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto la muestra con un anticuerpo como se define en la reivindicación 16 durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario; y
- b) detectar la presencia o la ausencia del complejo inmunitario formado en a).

27. Procedimiento para detectar *in vitro* la presencia o la ausencia de anticuerpos cultivados contra una cepa de *Streptococcus suis* en una muestra, que comprende las etapas de:

- a) poner en contacto la muestra con un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 durante un tiempo y bajo unas condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario; y
- b) detectar la presencia o la ausencia del complejo inmunitario formado en a).

28. Kit diagnóstico para la detección de la presencia o la ausencia de anticuerpos indicativos de la cepa de *Streptococcus suis*, que comprende:

- un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10;
- un reactivo para detectar un complejo inmunitario de polipéptido-anticuerpo;
- una muestra de referencia biológica que carece de anticuerpos que se unan inmunitariamente a dicho polipéptido; y
- una muestra de comparación que comprende unos anticuerpos que pueden unirse específicamente a dicho polipéptido;

en el que dichos polipéptido, reactivo, muestra de referencia biológica y muestra de comparación se encuentran presentes en una cantidad suficiente para llevar a cabo dicha detección.

29. Kit diagnóstico para la detección de la presencia o la ausencia de polipéptidos indicativos de la cepa de *Streptococcus suis*, que comprende:

- 5 - un anticuerpo según la reivindicación 16;
- un reactivo para detectar el complejo inmunitario de polipéptido-anticuerpo;
- una muestra de referencia biológica polipéptidos que se unen inmunitariamente a dicho anticuerpo; y
- 10 - una muestra de comparación que comprende unos polipéptidos que pueden unirse específicamente a dicho polipéptido;

en el que dichos anticuerpo, reactivo, muestra de referencia biológica y muestra de comparación se encuentran presentes en una cantidad suficiente para llevar a cabo dicha detección.

Figura 1

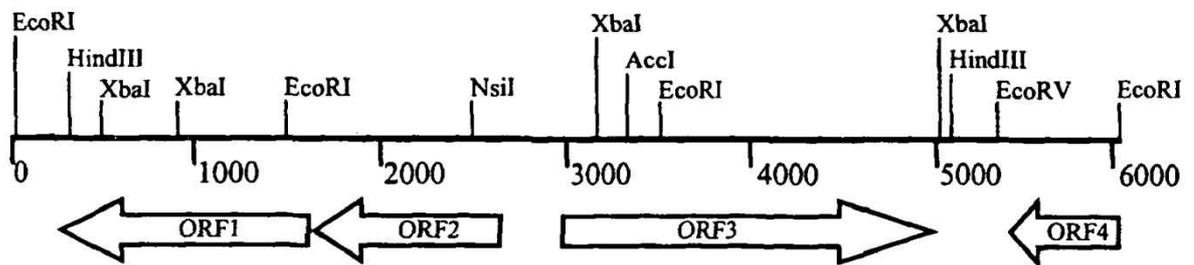


Figura 2

Ctttgagaaggaaggaata ATGAATACTAAGAAATGGAGAACATCGCTCCTAATACCAGGAATAGTATTATTTGGAACTGTTGCT 90
M N T K K W R T S L L I P G I V L F G T V A 22
↓
CTAGTGAATAATGTATCGGCACAAGAAGTAAAAATACCATCATCAGCGCAAAAACAACCTGATGGGGACAGGCTACTTCAAAGCGGTT 180
L V N N V S A Q E V K N T I I S A K Q P D G G Q A T S K A V 52
AATGTCAAAATACCAGCAGTAGTACGACTATTTGGTCGTGAGCTTCTAGAAAATGAATTTAAATTTGAGCTTAGAGAAGCGAATGGCGAG 270
N V K I P A V V R L F G R E L L E N E F K F E L R E A N G E 82
GAACTCCCTGCTTGTATACAGCTCAAAATACAAAAGAGGGTCAAGTTAGATTTAAAAATCTATCATTCGATAAGCCTGGCAAATACTGG 360
E L P V L D T A Q N T K E G Q V R F K N L S F D K P G K Y W 112
TATACAATTTCAGAAGTAAAAGATGAGCTTGGTGGTATTGAGTATGATTGCAAAATATATTGTAGCAAAAATAACTGTAGAAGATCGAAAC 450
Y T I S E V K D E L G G I E Y D S K Y I V A K I T V E D R N 142
GGCAATTACAGGCAATGATCGAATTTATTGATAATGACAATGTCTTTAACAATTTCTATACACCTGCTCCAGCTGCTGCTAGTCTTTTCG 540
G Q L Q A M I E F I D N D N V F N N F Y T P A P A A A S L S 172
ATAAAAAAGTCTCGAGGGACGTACCTTAAACACCCGGTGAATTCGAATTTGTTTAAAAAATGAAAAAGGCGATGAAATCGAAAAGGTA 630
I K K V L E G R T L N T G E F E F V L K N E K G D E I E K V 202
AGCAATCAAGCAGATGGTTCTGTAAACTTTAGTCCCTAACATTTACAAAAGAGGGAACCTATACCTACACTGTTTCAAGAGTTGATGGT 720
S N Q A D G S V N F S A L T F T K E G T Y T Y T V S E V D G 232
GGACTTGGCGATATTATCTATGACAAATCAGATATTAAGCCACTGTTACTGTGAAAGATAACAATCACGGACAACCTAGTCTCAACAGTG 810
G L G D I I Y D K S D I K A T V T V K D N N H G Q L V S T V 262
ACTTATGAAAATAGCGATCAATCTTCGAGAATATTTTGAATCCTGGGAAGTTAATAGCGCCAACCACGGATAGCGTTATTACTGATAAT 900
T Y E N S D Q I F E N I L N P G K L I A P T T D S V I T D N 292
GAAGTCTCTAAGGAAGCAATGACCGGTAAGAGAAGGGAAATATCGAACCCCTGAAAAGCAAATGACTAATAAAGAGAAGGATAATATT 990
E V S K E A M T G K E K G N I E P P E K Q M T N K E K D N I 322
↳ R1
GAAACCTCTGAAAAACAGATGCCGAGTGTGTGAACGAAAATGCCGTAACACCTGAAAAGCAAATGACTAATAAAGAGAACGATAAGGTT 1080
E T S E K Q M P S V V N E N A V T P E K Q M T N K E N D K V 352
↳ R2
GTAATCTCTGAAAAACAAATGCCGAGTGTGTGAACGAAAATGCCGTAACACCTGAAAAGCAAATGACTAATAAAGAGAACGATAATATT 1170
V I S E K Q M P S V V N E N A V T P E K Q M T N K E N D N I 382
↳ R3
GAAACCTCTGAAAAACAGATGCCGAGTGTGTGAACGAAAATGCCGTAACACCTGAAAAGCAAATGACTAATAAAGAGAAGGATAATATT 1260
E T S E K Q M P S V V N E N A V T P E K Q M T N K E K D N I 412
↳ R4
GAAACCTCTGAAAAACAGATGCCGAGTGTGTGAACGAAAATGCCGTAACACCTGAAAAGCAAATGACTAATAAAGAGAAGGATAATATT 1350
E T S E K Q M P S V V N E N A V T P E K Q M T N K E K D N I 442
↳ R5
GAAACCTCTGAAAAACAAATGCCAAGCATTGTGAACGACATGGTCGTAACACCTCAAGAGCAAATGGCTAATAAAGAGAACGATAAGGTT 1440
E T S E K Q M P S I V N D M V V T P Q E Q M A N K E N D K V 472
↳ R6
GTAATCTCTGAAAAACAGATGCCAAGCATTGTGAACGACATGGTCGTAACACCTCAAGAACAAATGGCTAATAAAGAGAACGATAAGGTT 1530
V I S E K Q M P S I V N D M V V T P Q E Q M A N K E N D K V 502
↳ R7
GTAATCTCTGAAAAACAGATGCCAAGCATTGTGAACGACATGGTCGTAACACCTCAAGAACAAATGGCTAATAAAGAGAACGATAAGGTT 1620
V I S E K Q M P S I V N D M V V T P Q E Q M A N K E N D K V 532
↳ R8
GTAATCTCTGAAAAACAGATGCCAAGCATTGTGAACGACATGGTCGTAACACCTCAAGAACAAATGGCTAATAAAGAGAACGATAAGGTT 1710
V I S E K Q M P S I V N D M V V T P Q E Q M A N K E N D K V 562
↳ R9
GAAACCTCTGAAAAACAGATGCCCTGTTAATGAGAAGGACAATGCCGTAACACCTGAAAAGCAAATGGCTAATAAAGAGAAGGAAAATATC 1800
E T S E K Q M P V N E K D N A V T P E K Q M A N K E K E N I 592
↳ R10
GAAACCTCTAAAAACAGATACTGTTAATGAGAACAACCAAAATGGTACAGTCGAAGAAAATCAAACACTAAACCAACAACTGAAAAA 1890
E T S K K Q I P V N E N N Q N G T V E E N S N T K P T T E K 622

ACAGACAAGCAGGAGACTTCAACATTTAAAACCGAAACTGCTAAGCAAAATCTTACCAGTAACTGGTGAGAAAAGGAAGTTTATGGTTATTG 1980
T D K Q E T S T F K T E T A K Q I L P V T G E K G S L W L L 652

ACAAGTGGTATTATCGGGCTTGAATGCGTTATTTACACGTAACGTAATATATAA 2037
T S G I I G L A I A L F T R K R K L * 670
+ + + +

Figura 3

52	kqaletvqrllpvlcqahgltpeqvvaiaashdggkqaletvqrllpvlcq	Avr/PthA
	... :~::~ :~::~:~::~ :~::~:~::~ ... :~::~ :~::~	
319	KDNIETSEKQMPSSVVNENAVTPEKQMTNKEND--KVVIS--EKQMPSSVVN	SP1/Lys319-Val601
102	ahgltpdqvvaiaashdggkqaletvqrllpvlcqahgltpeqvvaiaesni	Avr/PthA
	.~::~ :~::~:~::~ . :~::~ :~::~:~::~ :~::~:~::~ :~::~:~::~	
365	ENAVTPEKQMTNKENDN----IETSEKQMPSSVVNENAVTPEKQMTNKE--	SP1/Lys319-Val601
152	ggkqaletvqrllpvlcqahgltpdqvvaiaashdggkqaletvqrllpvl	Avr/PthA
	... :~::~ :~::~:~::~ :~::~:~::~ . :~::~ :~::~:~::~ :~::~	
409	--KDNIETSEKQMPSSVVNENAVTPEKQMTNKEKDN----IETSEKQMPSS	SP1/Lys319-Val601
202	caahgltpeqvvaiaesn----iggkqaletvqrllpvlcqahgltpeqv	Avr/PthA
	.~::~:~::~ :~::~:~::~ :~::~:~::~:~::~ :~::~:~::~	
453	VNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQ-----MPSIVNDMVVTPQEQM	SP1/Lys319-Val601
248	aiaaangggkqaletvqrllpvlceahgltpdqvvaiaesn----iggkqal	Avr/PthA
~::~:~::~:~::~ :~::~:~::~ :~::~:~::~	
495	ANKEN----DKVVISEKQMPSSIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQ--	SP1/Lys319-Val601
296	etvqrllpvlceahgltpeqvvaiaaangggkqaletvqrllpvlcqahgl	Avr/PthA
	:~::~:~::~:~::~ :~::~:~::~ ... : :~::~ :~::~:~::~ :~::~:~::~	
539	-----MPSIVNDMVVTPQEQMANKEND----KVETSEKQMPVNEKDNVA	SP1/Lys319-Val601
346	tpdqvvaiaashdggkqaletvqrllpv	373 Avr/PthA
	:~::~:~::~ :~::~:~::~:~::~ :~::~:~::~	
579	TPEKQMA----NKEKENIETSKKQIPV	601 SP1/Lys319-Val601

Figura 4

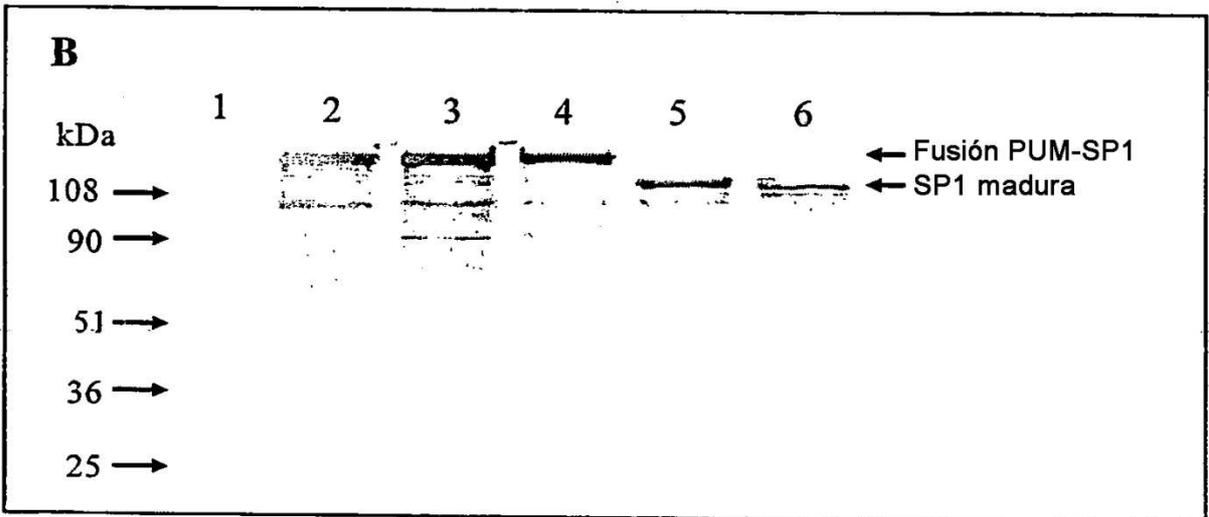
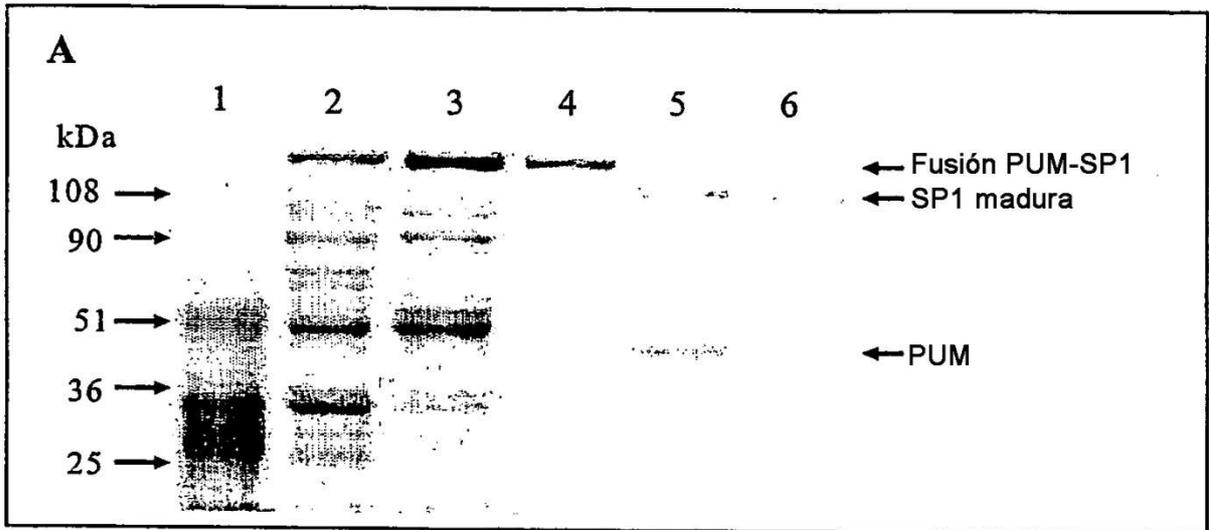
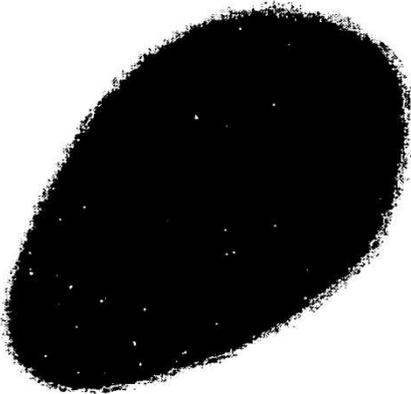


Figura 5

A



B

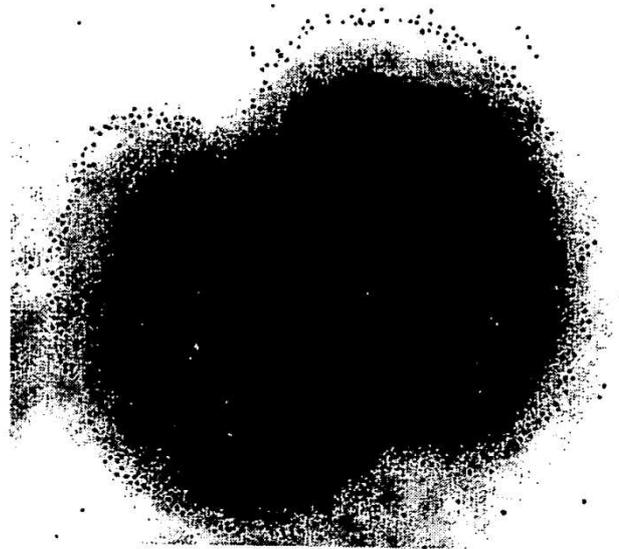


Figura 6

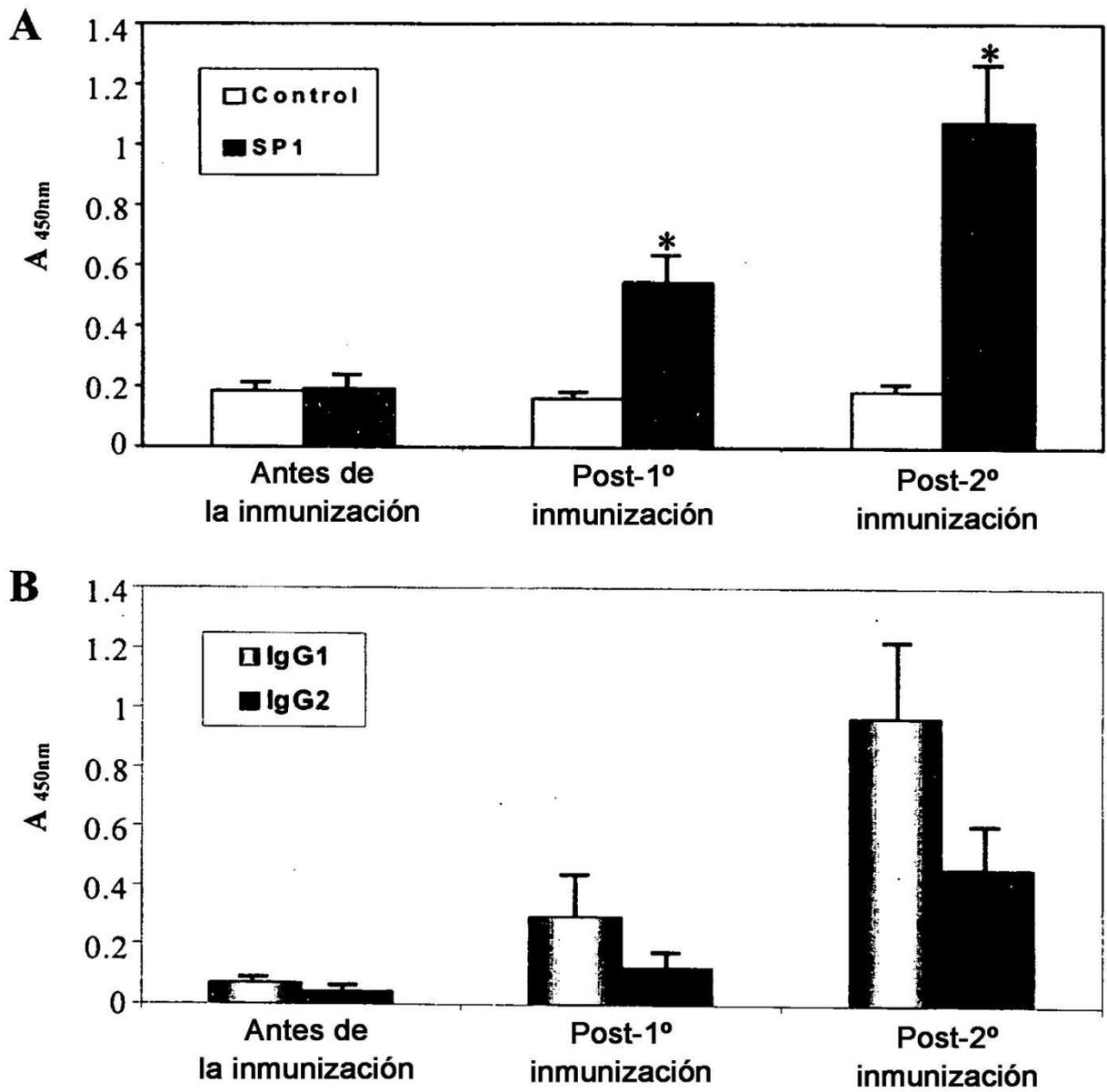


Figura 7

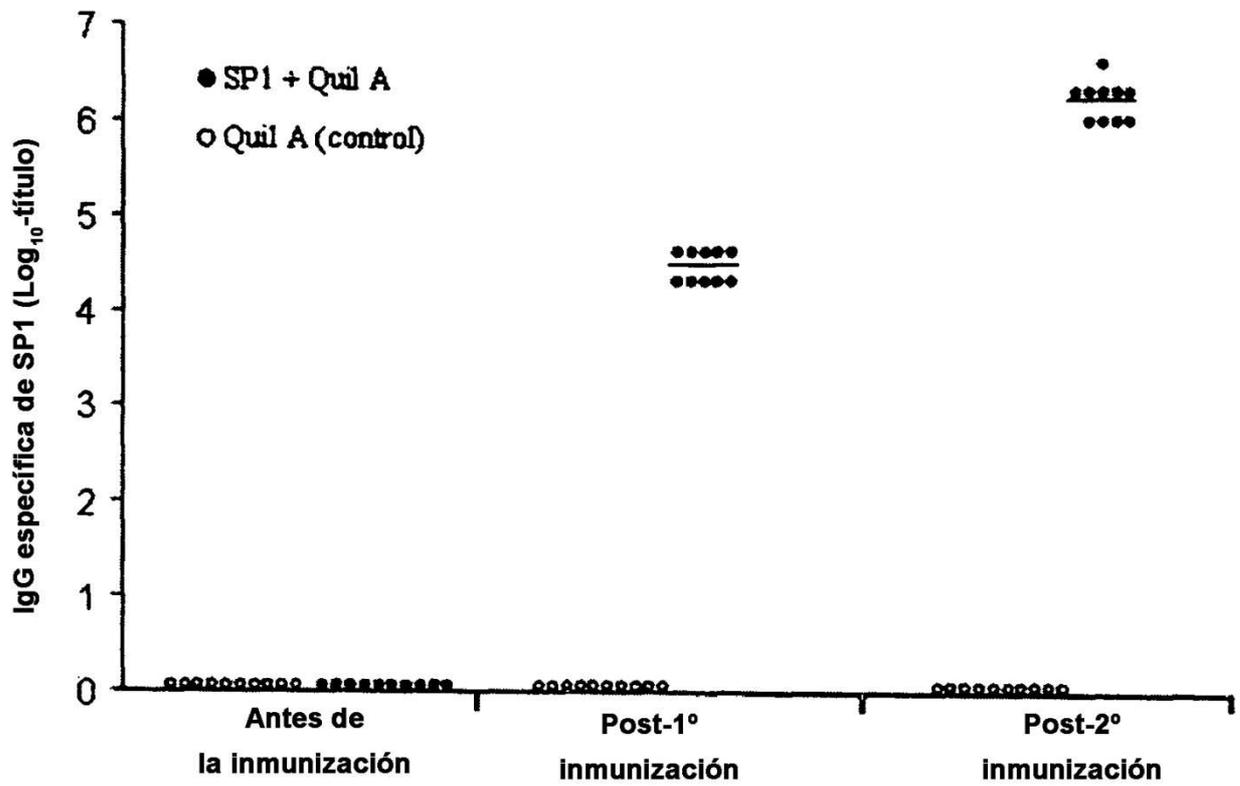


Figura 9

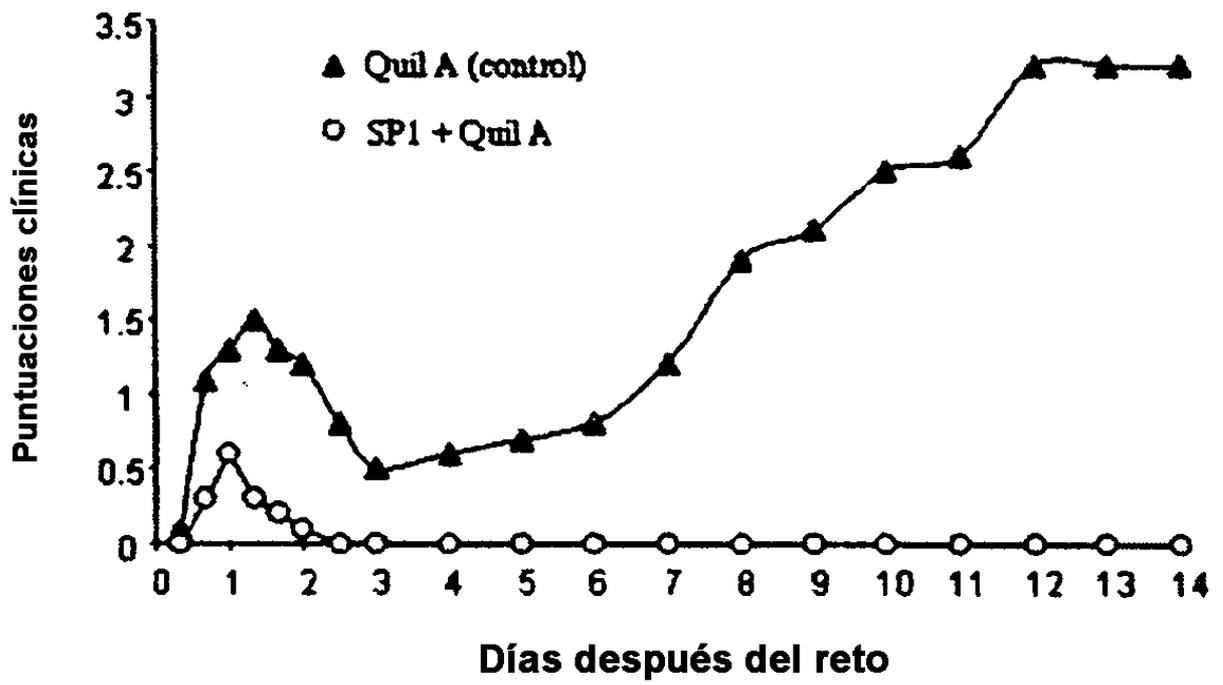


Figura 10

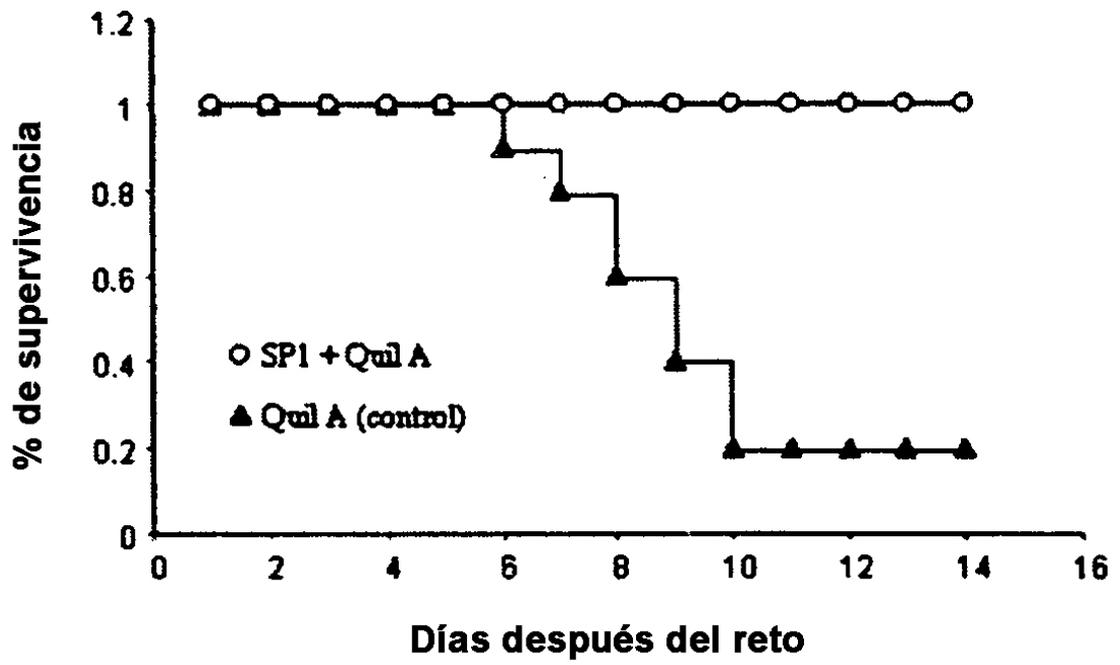
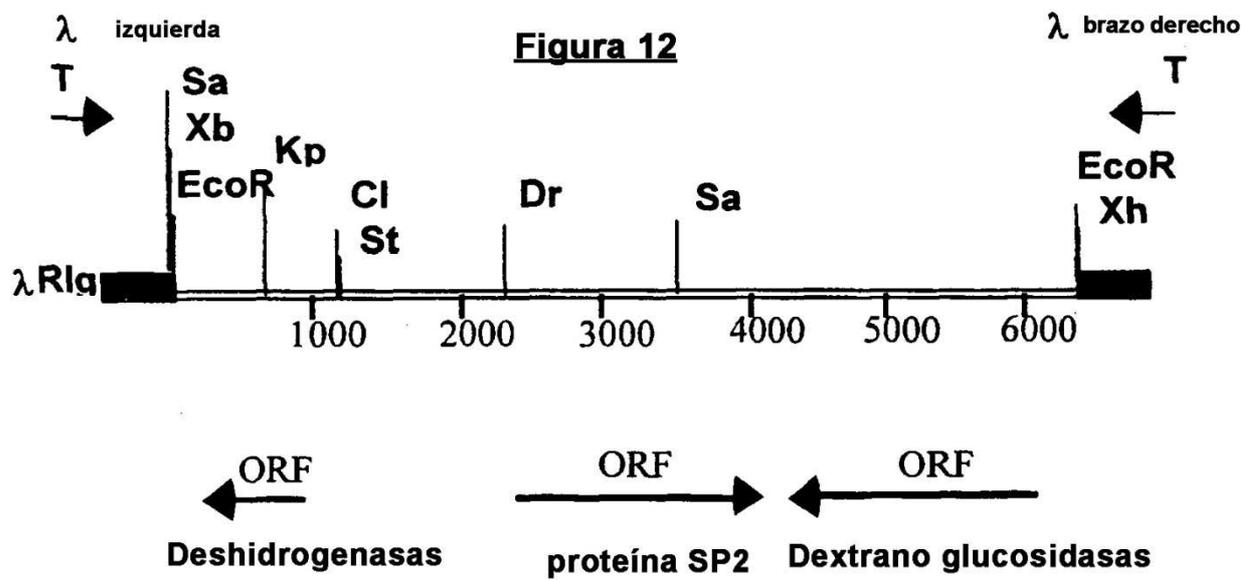


Figura 11

tcggcacaagaagtaaaaaataccatcatcagcgcacaaacaacctgatgggggacaggct
 S A Q E V K N T I I S A K Q P D G G Q A
 acttcaaaggcgggtaatgtcaaaataccagcagtagtacgactatgttggtcgtgagctt
 T S K A V N V K I P A V V R L F G R E L
 ctagaaaatgaatttaaatttgagcttagagaagcgaatggcgaggaactccctgtcctt
 L E N E F K F E L R E A N G E E L P V L
 gatcacagctcaaaatacaaaagaggggtcaagttagatttaaaaatctatcattcagataag
 D T A Q N T K E G Q V R F K N L S F D K
 cctggcaaaatactgggtatacaatttcagaagtaaaagatgagcttgggtgggtattgagtat
 P G K Y W Y T I S E V K D E L G G I E Y
 gattcgaatatattgtagcaaaaataaactgtagaagatcgaaacgggcaattacaggca
 D S K Y I V A K I T V E D R N G Q L Q A
 atgatcgaatttattgataatgacaatgtctttaacaatttctatacacctgctccagct
 M I E F I D N D N V F N N F Y T P A P A
 gctgctagtcttttcgataaaaaaagtcctcggaggacgtaccttaaacaccgggtgaattc
 A A S L S I K K V L E G R T L N T G E F
 gaatttgtttaaaaaatgaaaaggcgatgaatcgaaaaggtaagcaatcaagcagat
 E F V L K N E K G D E I E K V S N Q A D
 ggttctgtaaactttagtgccctaacatttcaaaaagaggggaacctatacctacactggt
 G S V N F S A L T F T K E G T Y T Y T V
 tcagaagttgatgggtggacttggcgatattatctatgacaaatcagatattaaggccact
 S E V D G G L G D I I Y D K S D I K A T
 gttactgtgaaagataaacaatcacggcaactagtctcaacagtgacttatgaaaatagc
 V T V K D N N H G Q L V S T V T Y E N S
 gatcaaatcttcgagaatattttgaaatcctgggaagttaatagcgcacaaccacggatagc
 D Q I F E N I L N P G K L I A P T T D S
 gttattactgataatgaagtctctaaggaagcaatggccggtaagagagaagggaaatc
 V I T D N E V S K E A M A G K E K G N I
 gaacccccctaaagagcaaatagctaatgaagagaaggataatattgaagcctctgaaaaa
 E P P K E Q I A N E E K D N I E A S E K
 cagatgccaagcattgtgaacgacatggtcgtaaacacctgaaaag
 Q M P S I V N D M V V T P E K



```

atgaaacgtaagagaacaaataaaccacaacatatacgctcgcaagagaaaaaacacctatc 60
  M K R K R T N K P Q H M R R K R K T P I 20
atgaaaaacaataagaagatggtatacacatcttcattggctctttccctcttttagtaca 120
  M K N N K K M L Y T S S L A L S L F S T 40
gggatgatttcgacaaatgtttttagccatcgaatgggctccacgtactgtttctgaaatt 180
  G M I S T N V L A I E W A P R T V S E I 60
agcccagaaattgtacaagaagaaggaaggatgacctatactgttcagtatggagatacc 240
  S P E I V Q E E G R M T Y T V Q Y G D T 80
ttatctgccatcgccctcagctatgaatattgatatggacttgctggcgaaaataaatcaa 300
  L S A I A S A M N I D M D L L A K I N Q 100
attgcagatgtcaacttgattttccctgatacggtaactgacgacgactggtgaccaaaac 360
  I A D V N L I F P D T V L T T T V D Q N 120
aatcaagtgactcaggttgagattgaagctcctgttcagggaaacacaaatgagaccggt 420
  N Q V T Q V E I E A P V Q G N T N E T V 140
caggcaactggtgacctaacacaacaaatcaagtaacgggttgaggatacgggtggtcccttg 480
  Q A T V D L T T N Q V T V E D T V V P L 160
gatcaaatctcatcagttaccgactcagcgcccgtagaggaagttgtagaacagcctgta 540
  D Q I S S V T D S A P V E E V V E Q P V 180
gcagaagcacctgtagaggaagttgtagaacaacctgtagtagaagcgcccgtagaggaa 600
  A E A P V E E V V E Q P V V E A P V E E 200
gttgtagaacagcctgtagtagaagcacctgtagaggaagttgcagaacaacctgtgggt 660
  V V E Q P V V E A P V E E V A E Q P V V 220
gaggcacctgtagaggaagtggtggagcaacctgtgggttgaggcacctgtagaggaagtt 720
  E A P V E E V V E Q P V V E A P V E E V 240
gcagaacaacctgtagtagaagcacctgtagaacagcctgtagttgaaactcccacaagtg 780
  A E Q P V V E A P V E Q P V V E T P Q V 260
acagccctatcaactactacaacaagtacaagtgcttatgatgtcgggttgcaacctcag 840
  T A L S T T T T S T S A Y D V G L Q P Q 280
gtagcagccttccgcgacagaagtagctaatagccttcgggtattacttcttctcaggttac 900
  V A A F R A E V A N A F G I T S F S G Y 300
cgctcctgggtgattctggcgaccatggtaagggattggcaattgactttatgggtgcctgag 960
  R P G D S G D H G K G L A I D F M V P E 320
agctcagctctaggagatcaagtgccagcttatgcagttgcaaaccttagcttctaaaaat 1020
  S S A L G D Q V A A Y A V A N L A S K N 340
atcaactacatcatttggaaacagcgcttctatgcgccgtatgacagtatctatgggtcca 1080
  I N Y I I W K Q R F Y A P Y D S I Y G P 360
gcctatacatggaaatctgatgccagaccgtggtagcattacagaaaaccactacgatcat 1140
  A Y T W N L M P D R G S I T E N H Y D H 380
gtgcatgtatcttttaattag 1158
  V H V S F N - 386

```

Figura 13

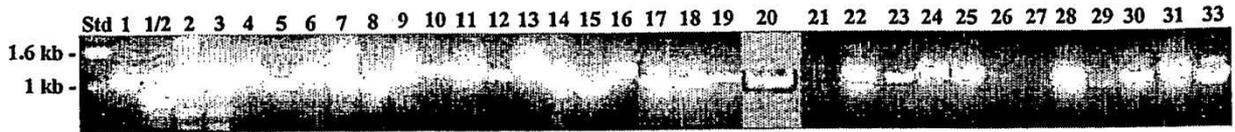


Figura 14

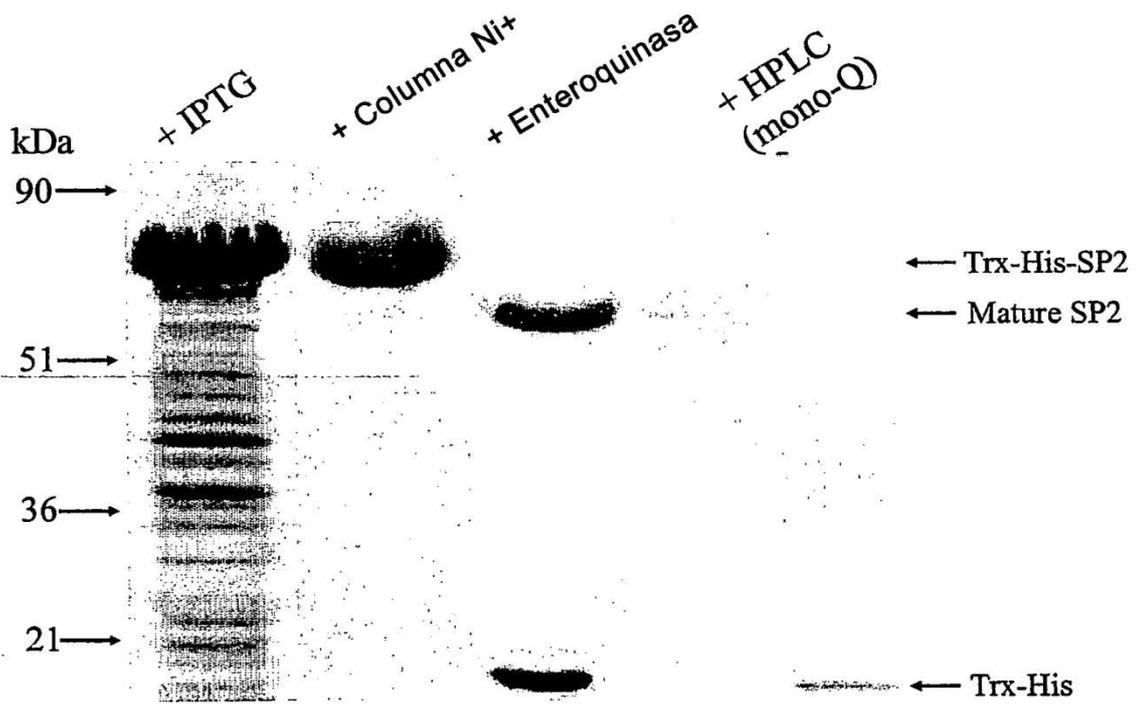


Figura 15

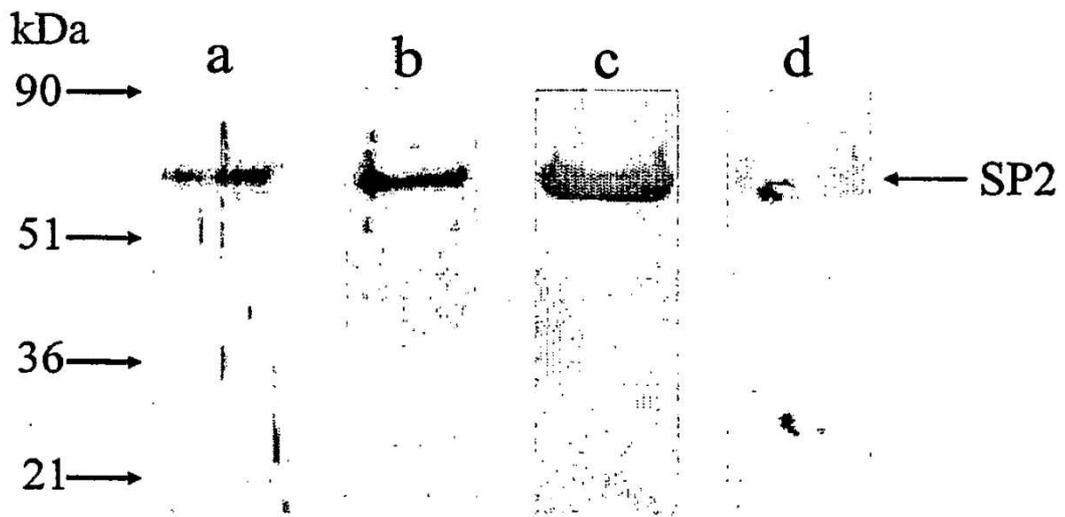


Figura 16

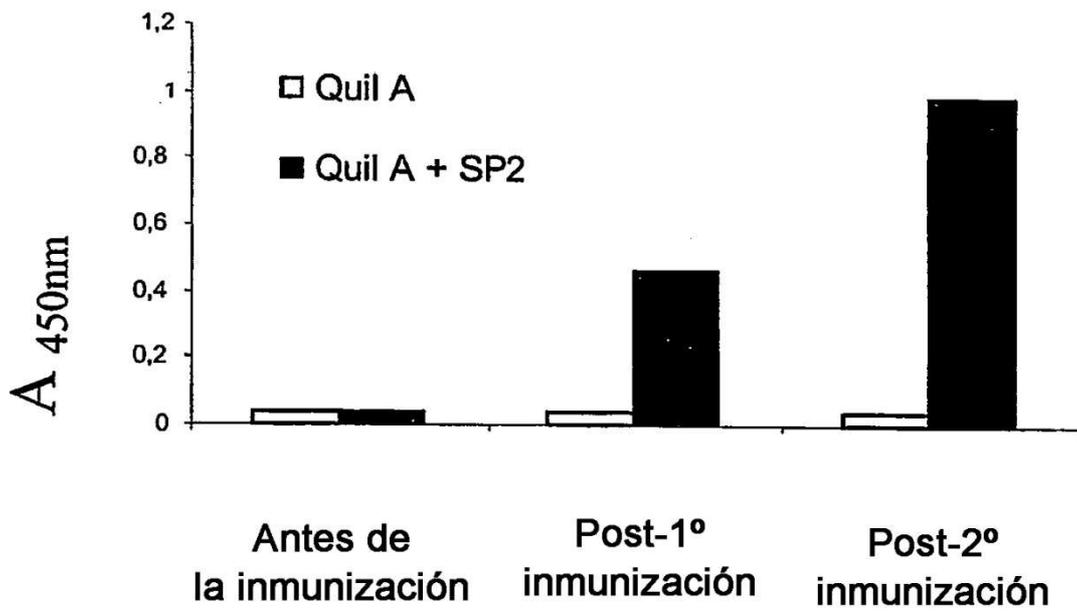


Figura 17

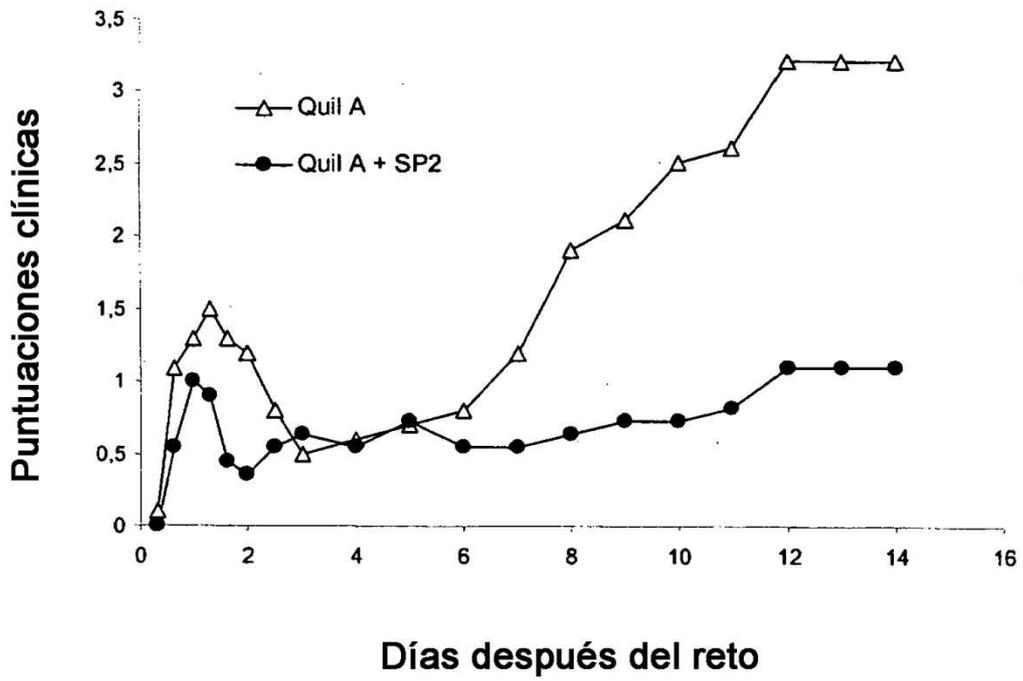


Figura 18

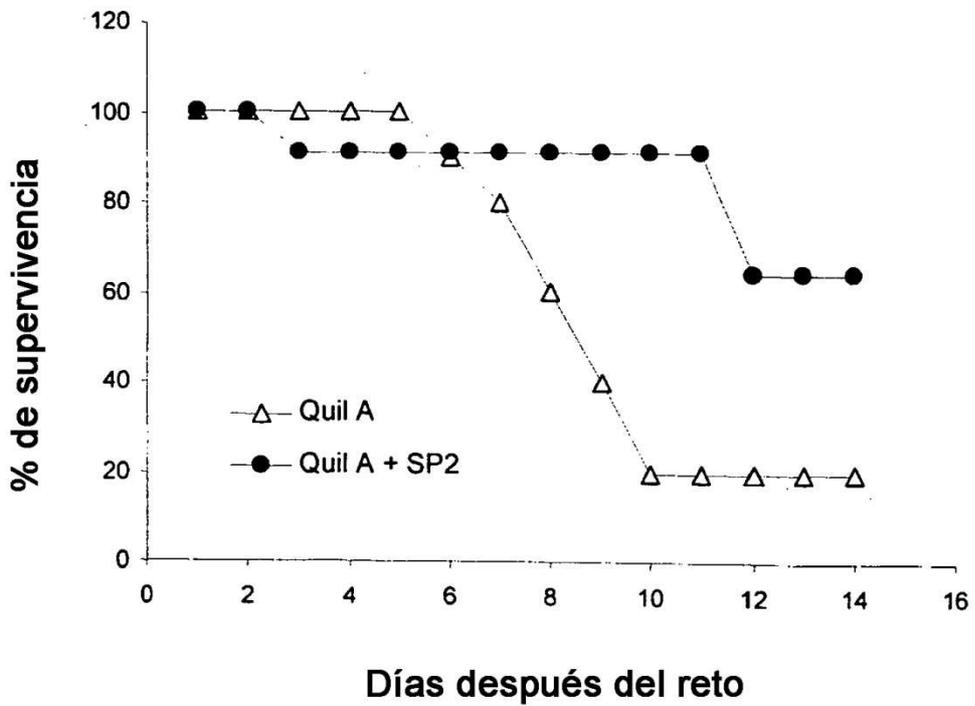


Figura 19

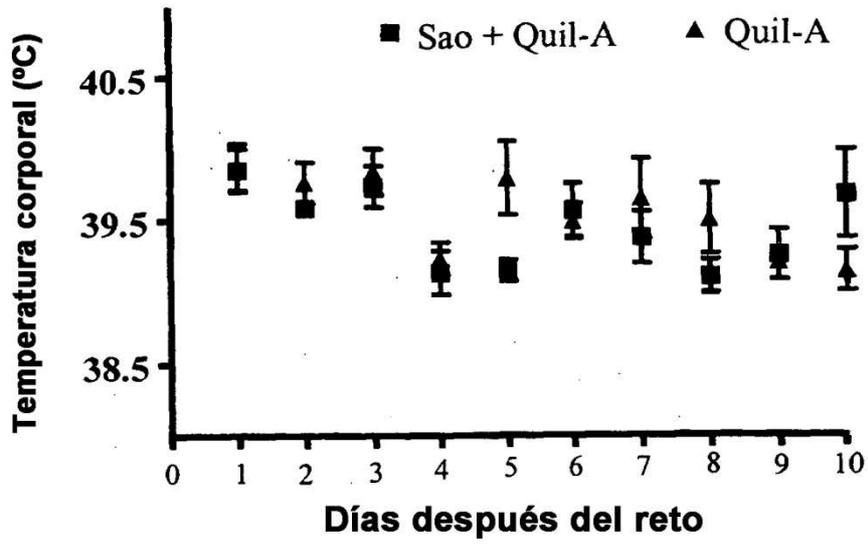


Figura 20

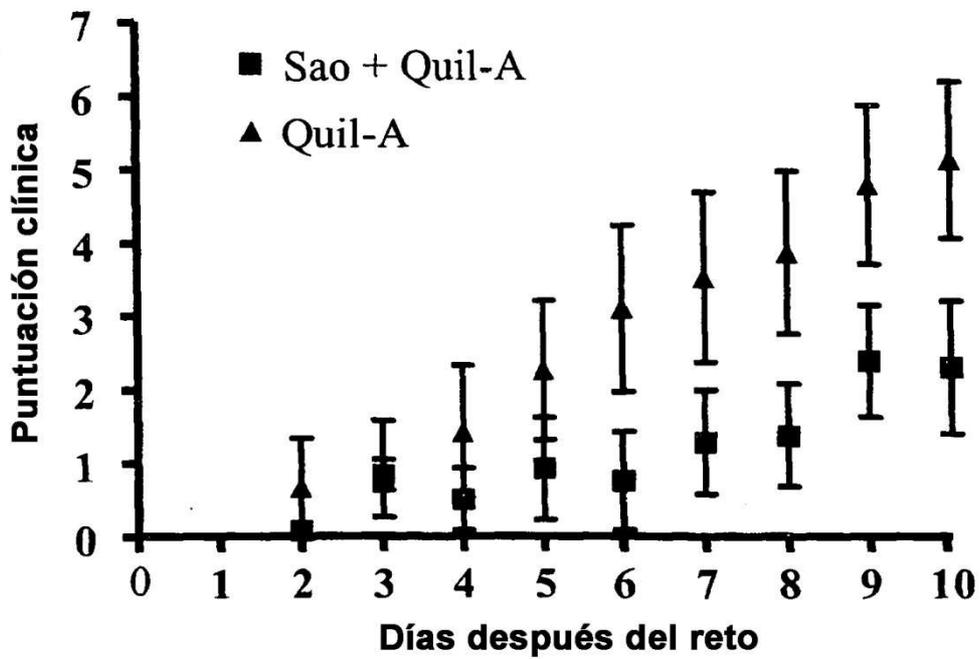


Figura 21

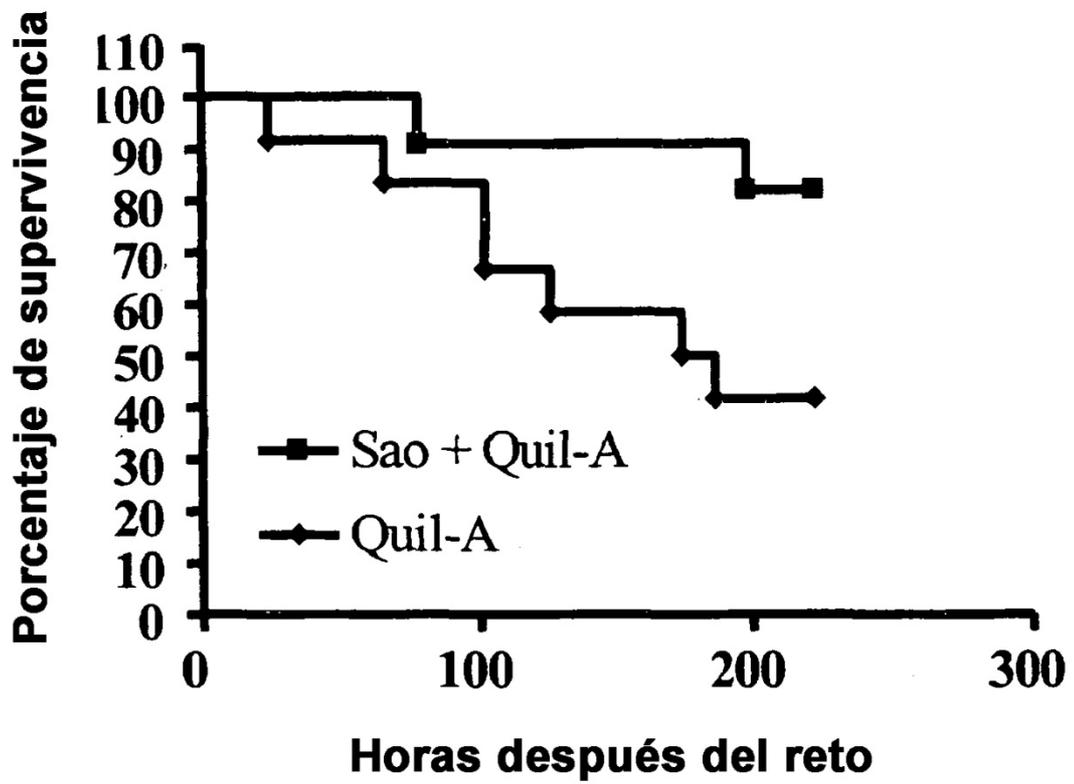


Figura 22

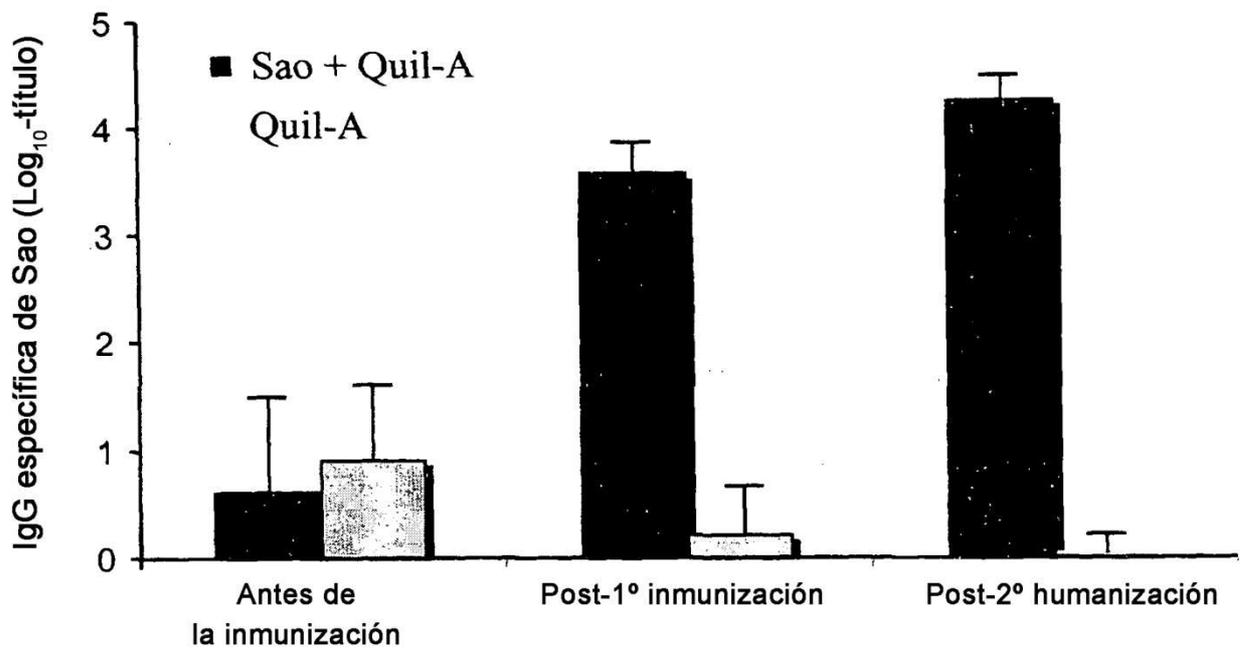


Figura 23

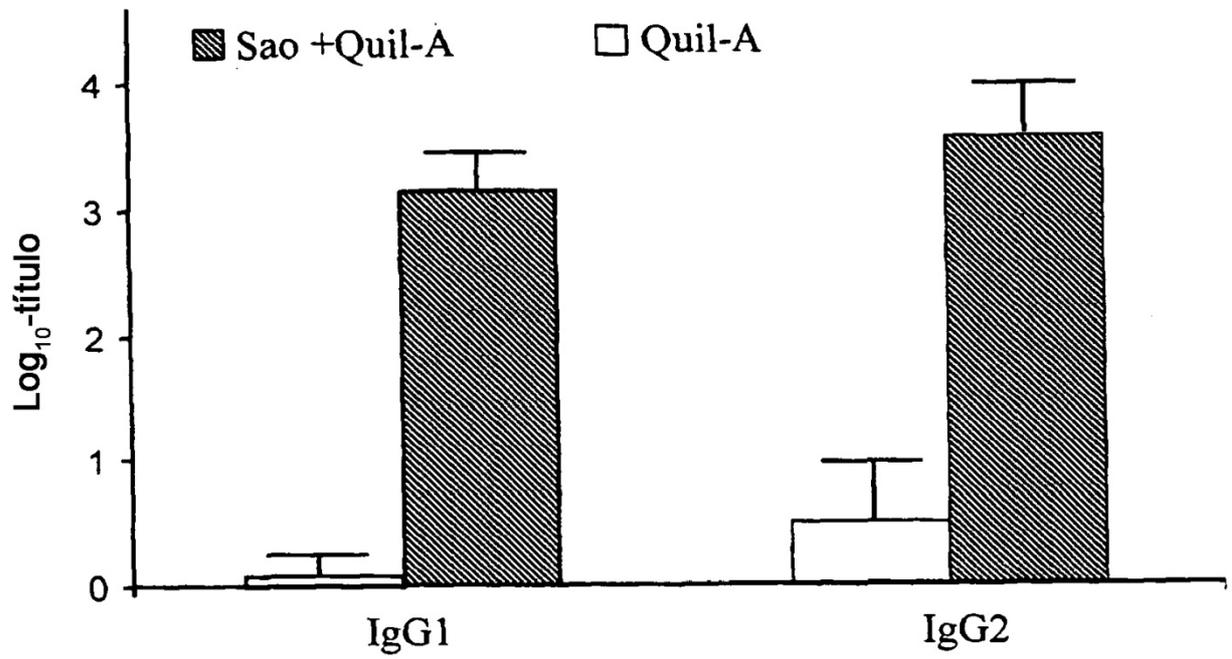


Figura 24

identidad de 86,6% en 670 residuos de solapamiento; puntuación: 5248,0; frecuencia de hueco: 13,4%

```

SEC ID nº 1      1 MNTKKWRTSLLIPGIVLFGTVALVNNVSAQEVKNTIIISAKQPDGGQATSKAVNVKIPAVV
SEC ID nº 2      1 MNTKKWRTSLLIPGIVLFGTVALVNNVSAQEVKNTIIISAKQPDGGQATSKAVNVKIPAVV
*****

SEC ID nº 1      61 RLFGRELLENENEFKELREANGEELPVLDTAQNTEGQVRFKNLSFDKPGKYWYTISEVKD
SEC ID nº 2      61 RLFGRELLENENEFKELREANGEELPVLDTAQNTEGQVRFKNLSFDKPGKYWYTISEVKD
*****

SEC ID nº 1     121 ELGGIEYDSKYIVAKITVEDRNGQLQAMIEFIDNDNVFNNFYTPAPAAASLSIKKVLEGR
SEC ID nº 2     121 ELGGIEYDSKYIVAKITVEDRNGQLQAMIEFIDNDNVFNNFYTPAPAAASLSIKKVLEGR
*****

SEC ID nº 1     181 TLNTGEFEFVLKNEKGDEIEKVSNOADGSVNFSALTFTEGTYTYTVSEVDGGLGDI IYD
SEC ID nº 2     181 TLNTGEFEFVLKNEKGDEIEKVSNOADGSVNFSALTFTEGTYTYTVSEVDGGLGDI IYD
*****

SEC ID nº 1     241 KSDIKATVTVKDNNHGQLVSTVTYENSQIFENILNPGKLIAPTTDSVITDNEVSKEAMA
SEC ID nº 2     241 KSDIKATVTVKDNNHGQLVSTVTYENSQIFENILNPGKLIAPTTDSVITDNEVSKEAMA
*****

SEC ID nº 1     301 GKEKGNIEPPKEQIANEEKDNI EASEKQMP SIVNDMVVTPQEQMTNKENDKVVISEKQMP
SEC ID nº 2     301 GKEKGNIEPPKEQIANEEKDNI EASEKQMP S-----
*****

SEC ID nº 1     361 SVVNENAVTPEKQMTNKENDNIETSEKQMP SVVNENAVTPEKQMTNKENDKNIETSEKQMP
SEC ID nº 2     332 -----

SEC ID nº 1     421 SVVNENAVTPEKQMTNKENDNIETSEKQMP SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQMP
SEC ID nº 2     331 -VVNENAVTPEKQMTNKENDNIETSEKQMP SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQMP
*****

SEC ID nº 1     481 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQMP SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQMP
SEC ID nº 2     390 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQMP SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQMP
*****

SEC ID nº 1     541 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVETSEKQMPVNEKDNAVTPQEQMANKEKENIETSKKQIP
SEC ID nº 2     450 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVETSEKQMPVNEKDNAVTPQEQMANKEKENIETSKKQIP
*****

SEC ID nº 1     601 VNENNQNGTVEENSNTKPTTEKTDKQETSTFKTETAKQILPVTGEKGLWLLTSGI IGLA
SEC ID nº 2     510 VNENNQNGTVEENSNTKPTTEKTDKQETSTFKTETAKQILPVTGEKGLWLLTSGI IGLA
*****

SEC ID nº 1     661 IALFTRKRKL
SEC ID nº 2     570 IALFTRKRKL
*****
    
```

Figura 25

Identidad de 77,6% en 670 residuos de solapamiento; puntuación 4412,0; frecuencia de hueco: 22,4%

```

SEQ ID NO 1      1 MNTKKWRTSLIIPGIVLFGTVALVNNVSAQEVKNTIISAKQPDGGQATSKAVNVKIPAVV
SEQ ID NO 3      1 MNTKKWRTSLIIPGIVLFGTVALVNNVSAQEVKNTIISAKQPDGGQATSKAVNVKIPAVV
*****

SEQ ID NO 1     61 RLFGRELLENEFKFELREANGEELPVLDTAQNTKEGQVRFKNLSFDKPGKYWYTISEVKD
SEQ ID NO 3     61 RLFGRELLENEFKFELREANGEELPVLDTAQNTKEGQVRFKNLSFDKPGKYWYTISEVKD
*****

SEQ ID NO 1    121 ELGGIEYDSKYIVAKITVEDRNGQLQAMIEFIDNDNVFNNFYTPAPAAASLSIKKVLEGR
SEQ ID NO 3    121 ELGGIEYDSKYIVAKITVEDRNGQLQAMIEFIDNDNVFNNFYTPAPAAASLSIKKVLEGR
*****

SEQ ID NO 1    181 TLNTGEFVFLKNEKGDEIEKVSNQADGSVNFSAITFTKEGTYTYTVSEVDGGLGDI IYD
SEQ ID NO 3    181 TLNTGEFVFLKNEKGDEIEKVSNQADGSVNFSAITFTKEGTYTYTVSEVDGGLGDI IYD
*****

SEQ ID NO 1    241 KSDIKATVTVKDNNHGQLVSTVYENSQDI FENILNPGKLIAPTTDSVITDNEVSKEAMA
SEQ ID NO 3    241 KSDIKATVTVKDNNHGQLVSTVYENSQDI FENILNPGKLIAPTTDSVITDNEVSKEAMA
*****

SEQ ID NO 1    301 GKEKGNIEPPKEQIANEEKDNI EASEKQMP SIVNDMVVTP EKQMTN KENDKVVI SEKQMP
SEQ ID NO 3    301 GKEKGNIEPPKEQIANEEKDNI EASEKQMP SIVNDMVVTP EKQMTN KENDKVVI SEKQMP
*****

SEQ ID NO 1    361 SVVNENAVTPEKQMTN KENDNI ETSEKQMP SVVNENAVTPEKQMTN KEKDNI ETSEKQMP
SEQ ID NO 3    361 SVVNENAVTPEKQMTN KENDNI ETSEKQMP SVVNENAVTPEKQMTN KEKDNI ETSEKQMP
*****

SEQ ID NO 1    421 SVVNENAVTPEKQMTN KEKDNI ETSEKQMP SIVNDMVVTP QEQMANKENDKVVI SEKQMP
SEQ ID NO 3    421 SVVNENAVTPEKQMTN KEKDNI ETSEKQ-----
*****

SEQ ID NO 1    481 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVI SEKQMP SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVI SEKQMP
SEQ ID NO 3    449 -----

SEQ ID NO 1    541 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVETSEKQMPVNEKDNAVTP EKQMAN KEKENI ETSKKQIP
SEQ ID NO 3    448 ----- IP
**

SEQ ID NO 1    601 VNENNQNGTVEENSNTKPTTEKTDKQETSTFKTETAKQILPVTGEGKSLWLLTSGI IGLA
SEQ ID NO 3    450 VNENNQNGTVEENSNTKPTTEKTDKQETSTFKTETAKQILPVTGEGKSLWLLTSGI IGLA
*****

SEQ ID NO 1    661 IALFTRKRKL
SEQ ID NO 3    510 IALFTRKRKL
*****

```

Figura 26

84,3% de identidad en 580 residuos de solap.;Puntuación:4463,0;Frecuencia de hueco:10,3%

```

SEC ID n° 1 MNTKKWRTSLLIPGIVLFGTVALVNNVSAQEVKNTIIIAKQPDGGQATSKAVNVKIPAVV
SEC ID n° 1 MNTKKWRTSLLIPGIVLFGTVALVNNVSAQEVKNTIIIAKQPDGGQATSKAVNVKIPAVV
*****

SEC ID n° 61 RLFGRELLENFVKFELREANGEELPVLDTAQNTEGQVRFKNLSFDKPGKYWYTI SEVKD
SEC ID n° 61 RLFGRELLENFVKFELREANGEELPVLDTAQNTEGQVRFKNLSFDKPGKYWYTI SEVKD
*****

SEC ID n° 121 ELGGIEYDSKYIVAKITVEDRNGQLQAMIEFIDNDNVFNNTYTPAPAAAASLSIKKVLGR
SEC ID n° 121 ELGGIEYDSKYIVAKITVEDRNGQLQAMIEFIDNDNVFNNTYTPAPAAAASLSIKKVLGR
*****

SEC ID n° 181 TLNTGEFVFLKNEKGDEIEKVSQADGSVNFSAFTFTKEGTYTYTVSEVDGGLGDI IYD
SEC ID n° 181 TLNTGEFVFLKNEKGDEIEKVSQADGSVNFSAFTFTKEGTYTYTVSEVDGGLGDI IYD
*****

SEC ID n° 241 KSDIKATVTVKDNHNGQLVSTVTVYENSQIFENILNPGKLIAPTDSVITDNEVSKEAMA
SEC ID n° 241 KSDIKATVTVKDNHNGQLVSTVTVYENSQIFENILNPGKLIAPTDSVITDNEVSKEAMA
*****

SEC ID n° 301 GKEKGNIEPPKEQIANEEKDNIEASEKQMP-----
SEC ID n° 301 GKEKGNIEPPKEQIANEEKDNIEASEKQMPVVNENAVTPEKQMTNKEKDNIETSEKQMP
*****

SEC ID n° 332 -IVNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQMPVVNENAVTPEKQMTNKEKDNIETSEKQMP
SEC ID n° 361 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQMP SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQMP
***** ** ***** ** ** *

SEC ID n° 391 SVNENAVTPEKQMTNKEKDNIETSEKQMPVVNE-----
SEC ID n° 421 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQMP SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVISEKQMP
* ** * ** * ** * ** *

SEC ID n° 426 -----NAVTPQEQMANKENDKVVISEKQMP SIVNENAVTPEKQMTNKEKDNIETSEKQMP
SEC ID n° 481 VNEKDNAVTPQEQMANKENDKVVISEKQMP SIVNENAVTPEKQMTNKEKDNIETSEKQMP
***** ** * ** * ** * ** *

SEC ID n° 481 FKTETAKQILPVTGEKGSLLWLLTSGI IGLAIALFTRKRKL
SEC ID n° 541 FKTETAKQILPVTGEKGSLLWLLTSGI IGLAIALFTRKRKL
*****

```

Figura 27

Figura 28

Alineación en formato (tipo) CLUSTAL utilizando MAFFT (v5.860)

```

SEC ID n°1      MNTKKWRTSLLIPGIVLFGTVALVNNVSAQEVKNTIISAKQPDGGQATSKAVNVKIPAVV
SEC ID n°2      MNTKKWRTSLLIPGIVLFGTVALVNNVSAQEVKNTIISAKQPDGGQATSKAVNVKIPAVV
SEC ID n°3      MNTKKWRTSLLIPGIVLFGTVALVNNVSAQEVKNTIISAKQPDGGQATSKAVNVKIPAVV
*****

SEC ID n°1      RLFGRELLENENEFKFEFREANGEELPVLDTAQTKEGQVRFKNLSFDKPGKYWYTISEVKD
SEC ID n°2      RLFGRELLENENEFKFEFREANGEELPVLDTAQTKEGQVRFKNLSFDKPGKYWYTISEVKD
SEC ID n°3      RLFGRELLENENEFKFEFREANGEELPVLDTAQTKEGQVRFKNLSFDKPGKYWYTISEVKD
*****

SEC ID n°1      ELGGIEYDSKYIVAKITVEDRNGQLQAMIEFIDNDNVFNNFYTPAPAAAASLSIKKVLEGR
SEC ID n°2      ELGGIEYDSKYIVAKITVEDRNGQLQAMIEFIDNDNVFNNFYTPAPAAAASLSIKKVLEGR
SEC ID n°3      ELGGIEYDSKYIVAKITVEDRNGQLQAMIEFIDNDNVFNNFYTPAPAAAASLSIKKVLEGR
*****

SEC ID n°1      TLNTGEFEFVLKNEKGDEIEKVSNOADGSVNFSAFTFTKEGTYTYTVSEVDGGLGDIID
SEC ID n°2      TLNTGEFEFVLKNEKGDEIEKVSNOADGSVNFSAFTFTKEGTYTYTVSEVDGGLGDIID
SEC ID n°3      TLNTGEFEFVLKNEKGDEIEKVSNOADGSVNFSAFTFTKEGTYTYTVSEVDGGLGDIID
*****

SEC ID n°1      KSDIKATVTVKDNNHGQLVSTVTVYENSQDIFENILNPGKLIAPTTSVITDNEVSKEAMA
SEC ID n°2      KSDIKATVTVKDNNHGQLVSTVTVYENSQDIFENILNPGKLIAPTTSVITDNEVSKEAMA
SEC ID n°3      KSDIKATVTVKDNNHGQLVSTVTVYENSQDIFENILNPGKLIAPTTSVITDNEVSKEAMA
*****

SEC ID n°1      GKEKGNIEPPKEQIANEEKDNIEASEKQMPDIVNDMVVTPPEKQMTNKENDKVVISEKQMP
SEC ID n°2      GKEKGNIEPPKEQIANEEKDNIEA-----
SEC ID n°3      GKEKGNIEPPKEQIANEEKDNIEA-----
*****

SEC ID n°1      SVVNENAVTPEKQMTNKENDNIETSEKQMPDIVNDMVVTPPEKQMTNKENDKVVISEKQMP
SEC ID n°2      -----SEKQMP
SEC ID n°3      -----

SEC ID n°1      SVVNENAVTPEKQMTNKENDNIETSEKQMPDIVNDMVVTPPEKQMTNKENDKVVISEKQMP
SEC ID n°2      SVVNENAVTPEKQMTNKENDNIETSEKQMPDIVNDMVVTPPEKQMTNKENDKVVISEKQMP
SEC ID n°3      -----SEKQMP
*****
    
```

Figura 28 (continuación)

SEC ID n°1 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVI SEKQMP SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVI SEKQMP
SEC ID n°2 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVI SEKQMP SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVI SEKQMP
SEC ID n°3 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVVI SEKQMP SVV NENAVTPEKQMTN KENDNIETSEKQMP
*****: ** :*****: ** : .***: ** :*****: *****

SEC ID n°1 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVETSEKQMPVNEKDNAVTPEKQMANKEKENIETSKKQIP
SEC ID n°2 SIVNDMVVTPQEQMANKENDKVETSEKQMPVNEKDNAVTPEKQMANKEKENIETSKKQIP
SEC ID n°3 SVV NENAVTPEKQMTN KENDNIETSEKQMP SVV NENAVTPEKQMTN KENDNIETSEKQIP
* : ** : .*** : ** : ** : * : : ***** : : ***** : ***** : *****

SEC ID n°1 VNENNQNGTVEENSNTKPTTEKTDKQETSTFKTETAKQILPVTGEKGSLLWLLTSGI IGLA
SEC ID n°2 VNENNQNGTVEENSNTKPTTEKTDKQETSTFKTETAKQILPVTGEKGSLLWLLTSGI IGLA
SEC ID n°3 VNENNQNGTVEENSNTKPTTEKTDKQETSTFKTETAKQILPVTGEKGSLLWLLTSGI IGLA

SEC ID n°1 IALFTRKRKL
SEC ID n°2 IALFTRKRKL
SEC ID n°3 IALFTRKRKL
