

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 520**

51 Int. Cl.:

C07K 14/315 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2011 PCT/SE2011/050652**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2011 WO11149419**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2011 E 11786995 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2590994**

54 Título: **Vacuna contra infecciones estreptocócicas basada en proteínas recombinantes**

30 Prioridad:

26.05.2010 US 348376 P

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

17.05.2017

73 Titular/es:

**INTERVACC AB (100.0%)
P.O. Box 112
129 22 Hägersten, SE**

72 Inventor/es:

**GUSS, BENGT;
FLOCK, JAN-INGMAR;
FRYKBERG, LARS y
FLOCK, MARGARETA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 612 520 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra infecciones estreptocócicas basada en proteínas recombinantes

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a composiciones inmunógenas o de vacuna de subunidad y el uso de las mismas para inmunización de mamíferos susceptibles a infecciones estreptocócicas. La invención también se refiere a métodos para preparar, formular y administrar dichas composiciones.

10

Antecedentes de la invención

Las infecciones estreptocócicas en caballos son causadas principalmente por la especie *Streptococcus equi*, que comprende tres subespecies designadas *equi*, *zooepidemicus*, y *ruminantium* respectivamente, llamadas en lo sucesivo simplemente *S. equi*, *S. zooepidemicus* y *S. ruminantium* (Ref. 15, 24, 40).

15

S. equi que está virtualmente confinado a caballos es el agente causante de la adenitis equina, una enfermedad grave distribuida por todo el mundo y altamente contagiosa de las vías respiratorias superiores de los *Equidae*. La adenitis equina es una de las enfermedades equinas más frecuentemente notificadas en el mundo y se caracteriza por fiebre, rinorrea, y formación de abscesos en los ganglios linfáticos retrofaríngeo y mandibular. En algunos casos, la enfermedad muestra un desarrollo metastásico en el cuerpo, llamado "adenitis equina bastarda". La enfermedad tiene una distribución por todo el mundo y causa grandes pérdidas económicas (Ref. 39).

20

S. zooepidemicus se considera un comensal oportunista que a menudo aparece en las vías respiratorias superiores de caballos sanos. Sin embargo, después de estrés o infección vírica, puede causar una infección secundaria, que da como resultado síntomas similares a los de la adenitis equina. Además, *S. zooepidemicus* infecta no solamente a caballos sino también a una amplia gama de otros animales, como cerdos, cabras, perros, gatos y vacas. Incluso se han notificado casos de infección en ser humano debido a la subsp. *zooepidemicus* (Ref. 5). Esta subespecie ha estado implicada como patógeno primario en afecciones tales como endometritis, cervicitis, aborto, mastitis, neumonía, abscesos e infecciones articulares.

25

30

S. ruminantium se ha aislado a partir de leche de ovejas y cabras con mastitis (Ref. 10).

35

Streptococcus pyogenes es un importante patógeno humano que causa diversas enfermedades por ejemplo impétigo, faringitis, fascitis necrosante y síndrome de choque tóxico.

Aunque es posible tratar y curar estas infecciones estreptocócicas con antibióticos, tales como penicilina, tetraciclina o gentamicina, un agente profiláctico eficaz que pudiera prevenir brotes de dichas infecciones y obviar o reducir el riesgo de desarrollo de cepas resistentes asociadas con el tratamiento con antibióticos, sería apreciado.

40

Descripción de la técnica relacionada

Sin embargo, aunque se han realizado muchos intentos de desarrollar agentes profilácticos tales como vacunas contra *S. equi*, en la actualidad no hay vacunas eficientes y seguras disponibles en el mercado, ni para la subsp. *equi* ni para la subsp. *zooepidemicus*, subsp. *ruminantium* o *S. pyogenes*.

45

Las vacunas existentes contra la adenitis equina se basan en cepas inactivadas, por ejemplo termoinactivadas, o atenuadas de *S. equi* o extractos con ácido/mutanolisina enriquecida en una o más proteínas M, es decir una o más proteínas inmunógenas producidas por *S. equi*. Una vacuna contra *S. zooepidemicus* basada en una proteína de tipo M se desvela en el documento US-A-5.583.014. En el documento WO 87/00436, Ref. 17 y el documento WO 2009/093014 A2 se desvelan cepas atenuadas de *S. equi* para uso como vacuna contra infecciones causadas por *S. equi*.

50

Una vacuna comercial contra la adenitis equina, Equilis StrepE de Intervet, Reino Unido, fue lanzada en 2004. Sin embargo, la seguridad y eficacia de esta vacuna, que se basa en una cepa atenuada (viva, mutada por delección) de *S. equi* puede ser cuestionada (Ref. 23, 35).

55

Dado que las vacunas o preparaciones inmunizadoras basadas en bacterias vivas o inactivadas desarrolladas previamente están lastradas por efectos secundarios y muchas proporcionan protección insuficiente, existe una necesidad de agentes profilácticos eficientes y seguros, tales como vacunas, que protejan contra infecciones por *S. equi* y/o prevengan la propagación de las mismas sin causar efectos secundarios indeseables.

60

Durante años, las proteínas superficiales estreptocócicas, que interactúan con y/o se unen a diferentes componentes de la matriz extracelular (MEC) o proteínas plasmáticas de la célula hospedadora, se han identificado y caracterizado. Los ejemplos de proteínas superficiales extracelulares de *S. equi* y *S. zooepidemicus* que han sido caracterizadas son FNZ (Ref. 29), EAG (Ref. 27), las proteínas similares a colágeno (ScIC, ScID, ScIE, ScIF, ScIG,

65

ScIH y ScII) (Ref. 21, 22), CNE (también llamada Sec) (Ref. 25), ZAG (Ref. 18 y documento WO 95/07296). Además, son ejemplos de proteínas extracelulares de *S. equi* que se supone que son liberadas al medio circundante SFS (Ref. 28), IdeE e IdeZ (Ref. 26), IdeE2 e IdeZ2 (Ref. 16). Estos tipos de proteínas son potenciales candidatos para uso como componentes activos para fines de inmunización.

5 Los usos de este tipo de proteínas como componentes en una vacuna potencial para protección de caballos contra la adenitis equina se desvelan en los documentos WO 2004/032957 A1, WO 00/37496, WO 2007/115059 A2, WO 98/01561 y WO 2009/075646 A1.

10 En el documento Flock, M., et al (2004) (Ref. 11), se notifica que en un modelo en ratón de adenitis equina, partes de las proteínas designadas FNZ, SFS y EAG, respectivamente, se usaron para inmunizar ratones. FNZ y EAG se consideraron candidatos prometedores para el desarrollo de una vacuna segura y eficaz contra la adenitis equina.

15 Timoney et al (2007) (Ref. 42) notificaron que proteínas extracelulares producidas por ADN recombinante de la subsp. *equi* son inútiles como componentes de vacuna. Se especuló en ese documento que resultados notificados con anterioridad para algunas proteínas de *S. equi* producidas mediante tecnología de ADN recombinante, que muestran protección en experimentos en ratones, no son aplicables a caballos. Por lo tanto, no resulta obvio que formas recombinantes de proteínas de *S. equi* localizadas de forma extracelular necesariamente sean funcionales como componentes de vacuna.

20 En la Ref. 45, se notifica la vacunación de caballos contra la adenitis equina usando los antígenos recombinantes EAG, CNE y ScIC de *S. equi*. En este estudio, los caballos vacunados mostraron, después de la provocación con *S. equi*, recuperación de bacterias significativamente reducida y niveles significativamente más bajos de rinorrea.

25 Aunque se han realizado muchos esfuerzos por desarrollar vacunas eficientes y algunos de los componentes inmunizadores presentados en las Ref. 14 y 15, documentos WO 2004/032957 A1, WO2009/075646 A1, son candidatos prometedores para uso en una vacuna que proteja contra infección por *S. equi*, el desarrollo de vacunas seguras que tengan un alto grado de inmunogenicidad y que muestren efectos secundarios limitados o ninguno sigue siendo deseable.

30 El patógeno humano *Streptococcus pyogenes* también expresa un gran número de proteínas extracelulares que interactúan con componentes de la MEC y/o sanguíneos del hospedador (Ref. 6, 7, 9, 33). Entre estos están una endoglucosidasa, llamada EndoS que tiene la capacidad de hidrolizar el núcleo de quitobiosa del glucano enlazado a asparagina en inmunoglobulina G humana (IgG) (Ref. 8). EndoS se ha caracterizado además en una serie de artículos, que describen por ejemplo propiedades enzimáticas, especificidad etc., (Ref. 1, 2, 3, 4, 34). El uso de EndoS en el tratamiento o la prevención de enfermedades mediadas por anticuerpos de IgG, tales como enfermedades autoinmunitarias, se desvela en el documento WO/2008/071418 A2 y el uso in vitro de EndoS para aislar y analizar IgG en el documento WO 2009/033670 A2. El uso de EndoS de *Streptococcus equi* subsp. *equi* y EndoSz de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, o fragmentos de las mismas, como componente en una
35
40 vacuna contra infecciones bacterianas o para desencadenar una respuesta inmunógena o una respuesta inmunitaria protectora, se desvela en el documento WO 2011/059385 A1.

Breve resumen de la invención

45 La presente invención se basa en una composición antigénica, adecuadamente inmunógena, que comprende múltiples antígenos, adecuadamente inmunógenos que comprenden al menos un epítipo antigénico o determinante antigénico derivado de una proteína presente en *S. equi* de acuerdo con la reivindicación 1, y el uso de la misma para inmunización de mamíferos no humanos contra *S. equi*. De acuerdo con la invención, al menos un componente de la composición es una proteína o polipéptido de fusión que comprende dos o más antígenos o fragmentos de los
50 mismos.

La presente invención también se refiere a una composición inmunógena o de vacuna de subunidad que comprende la composición antigénica mencionada anteriormente como componente inmunizador; a métodos para preparar dicha composición antigénica, adecuadamente inmunógena, o composición de vacuna contra *S. equi* en mamíferos
55 no humanos. De acuerdo con una realización adecuada, la presente invención se refiere a una vacuna que protege equinos, tales como caballos, contra enfermedades causadas por *S. equi*, por ejemplo adenitis equina, infecciones de las vías respiratorias superiores, infecciones de heridas y endometritis. La palabra "protege" es un término general que incluye cualquier cosa entre protección completa y reducción de la gravedad de la infección. El grado de protección puede medirse de diversas maneras, en relación, por ejemplo, con infecciones por *S. equi* en caballos, el efecto de la vacuna puede ser síntomas clínicos reducidos y enfermedad clínica reducida, donde puede observarse
60 reducción del aumento de temperatura, reducción de la hinchazón de ganglios linfáticos y reducción de la diseminación de bacterias a partir de animales infectados etc. Métodos y procedimientos sobre cómo medir la eficacia de una composición inmunizadora después de la provocación pueden obtenerse de, por ejemplo, la Ref. 14, y el documento WO 2009/075646 A1.

65

- 5 Por diversas razones, antes de realizar experimentos de vacunación y provocación en caballos, la evaluación de antígenos novedosos a usar en una vacuna se estudia en un modelo en un animal pequeño. Respecto a infecciones de las vías respiratorias superiores causadas por la subsp. *equi*, se ha descrito un modelo de vacunación e infección experimental adecuado y bien establecido (Ref. 11, 12, 13, 14, 16, 43, documentos WO 2004/032957 A1, WO 2009/075646 A1). Este modelo se ha usado con un alto grado de fiabilidad para cribar y evaluar antígenos de *S. equi* con potencial para provocar una respuesta inmunógena protectora en caballos (Ref. 13, 14).
- 10 En el contexto de infecciones causadas por *S. equi*, la expresión "mamíferos no humanos" se refiere principalmente a animales que pertenecen a la familia Equidae que consiste en caballos, burros y cebras y a híbridos de los mismos, tales como mulas y burdéganos. Camellos y dromedarios también están abarcados en ella.
- Los aspectos de la invención mencionados anteriormente, y realizaciones preferidas de la misma, se definen en las reivindicaciones adjuntas.
- 15 En realizaciones particulares, la presente invención utiliza polipéptidos seleccionados entre las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34.
- 20 La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de microbiología, tecnología de ADN recombinante y biología molecular e inmunología, que están dentro del alcance de la técnica. Dichas técnicas se explican en la bibliografía, por ejemplo, Sambrook et al (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual, 3ª ed. Cold Spring Harbour Press. A menos que se definan de otra manera, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la materia a la pertenece la invención.
- 25 Se entiende que un "fragmento" de una molécula tal como una proteína o ácido nucleico se refiere a una parte de la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos.
- 30 El término "análogo" se refiere a una variante de secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos que tiene una homología de secuencia ("identidad") del 80 % o más, especialmente el 90 % o más, con la secuencia de referencia. En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de las secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, respectivamente. Las técnicas para determinar la identidad de secuencia de ácido nucleico se conocen bien en la técnica, y están disponibles programas informáticos para calcular la identidad entre secuencias.
- 35 Muchas de las proteínas de *S. equi* tienen diferentes designaciones en diversos informes. Para facilitar la lectura de esta solicitud, en la tabla 1 a continuación se muestra designación alternativa respecto a informes/solicitudes de patente previas.

Tabla 1

Presente solicitud	Referencias	Designación alternativa
CNE	WO 2004/032957 A1 , SEC WO 2009/075646 A1 Ref. 25	
EAG	WO 2004/032957 A1 , WO 2009/075646 A1 Ref. 11	
Eq8	WO 2009/075646 A1 Ref. 14	SEQ0402
Eq5	WO 2009/075646 A1 Ref. 14	SEQ0256
A21	Ref. 22	ScIF
A36	Ref. 22	ScII
A42	WO 2004/032957 A1 , ScIC WO 2009/075646 A1 Ref. 22	
IdeE	WO 2009/075646 A1 Ref. 16, 26	
EndoSe	WO 2011/059385 A1	
Eq54	Ref. 14	SEQ0939
Eq27	Ref. 14	SEQ0944

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A son diagramas que muestran la temperatura rectal frente a días post-provocación en ponis vacunados en el estudio I con Strangvacc 2, Strangvacc 3/4 o placebo para los paneles A, B y C.

La figura 1B son diagramas que muestran la temperatura rectal frente a días post-provocación en ponis vacunados en el estudio II con Strangvacc 3/4, 5 o 7 para los paneles D, E y F.

La figura 1C son diagramas que muestran la temperatura rectal frente a días post-provocación en ponis vacunados en el estudio II con Strangvacc 8 o placebo para los paneles G y H.

La figura 2 es un diagrama que muestra valores post mortem acumulados para ponis individuales vacunados en los estudios I y II.

La figura 3 son diagramas que muestran niveles de anticuerpo en ponis vacunados con Strangvacc I (que contiene antígenos individuales) o Strangvacc 2 y 3/4 (datos combinados entre sí) (que contienen proteínas de fusión). El diagrama (panel) superior muestra anticuerpos contra CNE, y el diagrama (panel) inferior muestra anticuerpos contra Eq5 (SEQ0256).

La figura 4A es un diagrama que muestra el valor cuantitativo de anticuerpos contra Eq54 (n=10) y Eq27. Se muestran los valores cuantitativos de IgG en sueros de ratones inmunizados con Eq54 o Eq27, o que se dejaron sin vacunar. Se muestran valores medios y errores estándar de valores logarítmicos de diluciones requeridos para conseguir una absorbancia de 1,5 en ELISA. Se incluyen valores de ratones no vacunados.

La figura 4B es un diagrama que muestra la pérdida de peso de ratones infectados. Se muestra la pérdida de peso promedio a lo largo del tiempo de ratones infectados con *S. equi* subsp. *equi*. Los ratones (n = 3x10) habían sido vacunados previamente con antígenos tal como se indica. Se muestran valores medios y errores estándar.

La figura 4C es un diagrama que muestra la colonización nasal de ratones infectados. Se muestra el crecimiento nasal de *S. equi* subsp. *equi* a lo largo del tiempo de ratones infectados por *S. equi* subsp. *equi*. Los ratones (n = 3x10) habían sido vacunados previamente con antígenos tal como se indica. Se muestran valores medios y errores estándar.

Descripción detallada de la invención

Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere, generalmente, a la identificación de polipéptidos o proteínas de *S. equi* que sean capaces de desencadenar una respuesta inmunógena, cuando se administran a un mamífero; y a la identificación de polinucleótidos o genes que codifican estos polipéptidos o proteínas.

La presente invención también se refiere a fragmentos de dichos polipéptidos o proteínas o de dichos polinucleótidos o genes.

Más específicamente, se desvela cómo, fragmentos génicos de *S. equi* que codifican diversas proteínas extracelulares pueden, combinarse mediante tecnología de fusión de genes, expresarse en un hospedador adecuado y usarse como antígenos en una vacuna contra infecciones estreptocócicas en mamíferos. Aunque basada en dichos estudios, la presente divulgación no está limitada a las combinaciones específicas desveladas. Básicamente, los antígenos individuales representados en cada proteína de fusión pueden estar dispuestos en diversos número, orden o combinaciones. Teóricamente, un orden de los antígenos puede ser, por ejemplo, *extremo-N-A-B-C-D-E-extremo-C*, pero la posición de cada antígeno individual se puede cambiar y el número de los mismos modificarse. Además, también se desvela cómo pueden combinarse proteínas de fusión en una vacuna con proteínas no de fusión para obtener composiciones de vacuna eficientes.

En lo sucesivo, se hará referencia a diversas referencias de patente y bibliográficas.

La composición antigénica de la presente invención se selecciona entre: (A) una composición que comprende (i) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 22, comenzando a partir del aminoácido 12, (ii) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 24, comenzando a partir del aminoácido 12, y (iii) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 26, comenzando a partir del aminoácido 12; (B) una composición que comprende (i) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 28, comenzando a partir del aminoácido 12, (ii) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 30, comenzando a partir del aminoácido 12, y (iii) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 32, comenzando a partir del aminoácido 12; (C) una composición que comprende (i) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 34, comenzando a partir del aminoácido 12, (ii) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 30, comenzando a partir del aminoácido 12, y (iii) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 32, comenzando a partir del aminoácido 12; y (D) (i) una composición que comprende un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 34, comenzando a partir del aminoácido 12, y (ii) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 30, comenzando a partir del aminoácido 12.

Además, en el presente documento se describen composiciones antigénicas que comprenden varios antígenos, en las que cada antígeno comprende al menos parte de una proteína o polipéptido de *S. equi* o *S. zooepidemicus* y dicha al menos parte de dicha proteína o polipéptido comprende al menos un epítipo antigénico o determinante antigénico de *S. equi* o *S. zooepidemicus*, y en las que al menos parte de una proteína o polipéptido se selecciona entre el grupo que comprende:

- una proteína o polipéptido que se designa Eq85 y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 22;
- una proteína o polipéptido que se designa CCE y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 24;
- una proteína o polipéptido que se designa IdeE y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 26;
- una proteína o polipéptido que se designa CNEEAG y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 28;
- una proteína o polipéptido que se designa IE5 y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 30;
- una proteína o polipéptido que se designa EndoSe y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 32;
- una proteína o polipéptido que se designa CPCE y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 34;

Los antígenos descritos en el presente documento pueden combinarse además con al menos una parte de una proteína o polipéptido seleccionado entre el grupo que comprende:

- una proteína o polipéptido que se designa CNE y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el documento WO 2004/032957 A1, SEQ ID NO: 4;
- una proteína o polipéptido que se designa FNZ y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el documento WO 2004/032957 A1, SEQ ID NO: 2;
- una proteína o polipéptido que se designa SFS y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el documento WO 2004/032957 A1, SEQ ID NO: 3;
- una proteína o polipéptido que se designa ScIC y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el documento WO 2004/032957 A1, SEQ ID NO: 23;
- una proteína o polipéptido que se designa EAG y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el documento WO 2004/032957 A1, SEQ ID NO: 1, y el documento WO 2009/075646 A1, SEQ ID NO: 13;
- una proteína o polipéptido que se designa IdeE y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el documento WO 2009/075646 A1, SEQ ID NO: 10;
- una proteína o polipéptido que se designa IdeE2 y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el documento WO 2009/075646 A1, SEQ ID NO: 1;
- una proteína o polipéptido que se designa Eq5 y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el documento WO 2009/075646 A1, SEQ ID NO: 3;
- una proteína o polipéptido que se designa Eq8 y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el documento WO 2009/075646 A1, SEQ ID NO: 5;
- una proteína o polipéptido que se designa IdeZ2 y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el documento WO 2009/075646 A1, SEQ ID NO: 7;
- una proteína o polipéptido que se designa Eqz5 y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el documento WO 2009/075646 A1, SEQ ID NO: 8; y
- una proteína o polipéptido que se designa Eqz8 y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en el documento WO 2009/075646 A1, SEQ ID NO: 9;

o un análogo o fragmento de los mismos.

Por conveniencia, los polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos tal como se muestra en la lista de secuencias de los documentos WO 2009/075646 A1 y WO 2004/032957 A1 mencionados anteriormente frecuentemente se designan solamente CNE, FNZ, ScIC, SFS, EAG, IdeE, IdeE2, Eq5, Eq8, IdeZ2, Eqz5 y Eqz8, respectivamente. EAG, IdeE, IdeE2, Eq5 y Eq8 designan proteínas que pueden encontrarse en *S. equi* e IdeZ2, Eqz5 y Eqz8 designan proteínas que pueden encontrarse en *S. zooepidemicus*. Otros ejemplos son las proteínas M o similares a M, por ejemplo SeM descrita en la Ref. 42.

Ejemplos adicionales de antígenos que pueden estar incluidos en la composición antigénica descrita en el presente documento comprenden las proteínas ScIC ScID-ScII (n.º de acceso al genbank DQ158080, DQ158081, DQ158082, DQ158083, DQ158084, DQ158085), FNE (n.º de acceso AF360373), FNEB (n.º de acceso AY898649), FNEC-FNEF (Ref.24), SeM (n.º de acceso U73162 también llamada FBP n.º de acceso YP002747233), SzPSe (n.º de acceso U73162), seeH (n.º de acceso AF186180), seeM (n.º de acceso AJ583528), seel (GenBank, Gen ID7697191, SEQ_2037, Ref. 15), seeL (n.º de acceso AJ583527), Se51.9 (n.º de acceso AF521601), Se46.8 (n.º de acceso AF521600), Se24.3 (n.º de acceso AY137521), Se75.3 (n.º de acceso AY137528), Se110.0 (n.º de acceso AY137519), Se24.3 (AY137521), Se42.0 (n.º de acceso AY137521), Se117.0 (n.º de acceso AY137523), Se18.9 (n.º

de acceso DQ068464), ZAG (n.º de acceso U25852), *slaA* (n.º de acceso CAW93317), *slaB* (n.º de acceso CAW95519), *sagA* (n.º de acceso ACG61862), proteínas de biosíntesis de estreptolisina S (CW92800, CW92802, CW92798), precursor de estreptolisina S (CW92796), SpyCEP (n.º de acceso DQ413032), las proteínas similares a SpyCEP, SeCEP y SzoCEP (Ref. 43).

Sin embargo, las proteínas o fragmentos de polipéptido que pueden estar incluidos en las composiciones antigénicas descritas en el presente documento no están restringidas a las enumeradas anteriormente. En general, las composiciones pueden usarse en principio con cualquier proteína extracelular o fragmentos de la misma expresados en la superficie o proteínas transportadas al entorno de estreptococos patógenos, por ejemplo diferentes subsp. de *S. equi* o *S. pyogenes*. Mediante análisis de secuencias de ADN del genoma de estas bacterias por ejemplo http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_equi/; http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_zooepidemicus/; http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pyogenes/, pueden identificarse marcos de lectura abiertos que codifican proteínas extracelulares. Estas proteínas se caracterizan habitualmente por albergar una secuencia señal N-terminal responsable del transporte a través de la membrana después de la traducción. Un grupo interesante particular de proteínas para el desarrollo de vacunas son proteínas que, además de albergar la secuencia señal, también presentan un dominio C-terminal reconocido fácilmente que incluye un motivo de aminoácidos definido generalmente como, por ejemplo LPXTG, importante para anclar una proteína extracelular a la estructura del peptidoglucano de la pared celular bacteriana (Ref. 37). Cómo identificar dichas proteínas mediante métodos bioinformáticos, por ejemplo el programa informático SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), (Ref.19, 38), es bien conocido por los expertos en la materia.

Los antígenos o inmunógenos de las presentes composiciones antigénicas o inmunógenas pueden usarse en solitario o en combinación con otras combinaciones de fusión y/o en combinación con antígenos individuales.

Las composiciones antigénicas pueden comprender antígenos que son producidos mediante tecnología recombinante y/o al menos un antígeno que es un antígeno aislado o purificado, o fragmento del mismo, tal como las formas nativas producidas por las bacterias estreptocócicas (o mutantes sobreproductores). Las formas nativas pueden aislarse a partir de células o medios de cultivo a partir de bacterias cultivadas en medios adecuados, dando como resultado elevada producción de la proteína respectiva. Además, después de descubrir las condiciones de crecimiento óptimas (incluyendo condiciones fisiológicas) para obtener las proteínas nativas, también es posible construir cepas estreptocócicas sobreproductoras. Usando métodos bien conocidos por expertos en la materia, hay varias maneras de generar y aislar cepas sobreproductoras, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida, mutagénesis química, luz ultravioleta, etc. el procedimiento de purificación y aislamiento de una proteína extracelular a partir de medio de cultivo es bien conocido por expertos en la materia.

La aplicación de la presente divulgación no está limitada al uso de *E. coli* y vectores adecuados para esta bacteria como vehículos y herramientas para expresar polipéptidos recombinantes. Otros hospedadores y vectores se conocen bien en la técnica y pueden encontrarse en la bibliografía y en la bibliografía mencionada en el documento WO 2007/115059 A2. Además, la aplicación de la presente solicitud no está limitada a las secuencias de nucleótidos específicas de los antígenos desvelados en la invención, dado que puede ser necesario adaptar el uso de codones de las secuencias de nucleótidos específicas al hospedador de producción a usar. La técnica para sintetizar y adaptar el uso del codón es bien conocida para expertos en la materia.

En el presente documento se describe además una composición de vacuna para proteger a mamíferos no humanos contra infección por *S. equi*, que comprende una composición antigénica tal como se ha desvelado anteriormente como componente inmunizador, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Adecuadamente, la composición de vacuna descrita comprende una composición antigénica o inmunógena que contiene uno o más de los presentes antígenos o inmunógenos como componente o componentes inmunizadores. La composición de vacuna puede comprender componentes adicionales, tales como un adyuvante. Adecuadamente, dichos adyuvantes estimulan inmunidad sistémica o mucosal. Dichos adyuvantes se conocen bien en la técnica.

Los adyuvantes adecuados pueden comprender (1) polímeros de ácido acrílico o metacrílico, anhídrido maleico y polímeros de derivado de alqueno, (2) secuencias inmunoestimuladoras (ISS), (3) una emulsión de aceite en agua, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, (5) citoquinas, (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, (7) saponina o (8) nanopartículas o (9) cualesquiera combinaciones o mezclas de los mismos. Ejemplos adicionales de adyuvantes adecuados también pueden encontrarse en la bibliografía mencionada en el documento WO 2007/115059 A2.

Un adyuvante adecuado para uso de acuerdo con la presente divulgación son los adyuvantes Abisco, Matrix C y Matrix Q de Isconova AB, Suecia. Los componentes clave de ISCOMS son saponinas de *Quillaia* derivadas de la corteza del árbol *Quillaia jaborosa*, *Quillaia saporinaria molina*. Las saponinas de *Quillaia* son bien conocidas por su capacidad de activar el sistema inmunitario (Ref. 32). Las saponinas de *Quillaia* mezcladas con colesterol, y fosfolípidos en estequiometría específica, forman estructuras similares a una jaula abierta esférica conocidas como ISCOMS.

- Otro adyuvante adecuado es el Ginseng. El Ginseng es un extracto seco preparado a partir de la raíz de la planta *Panax ginseng*, C.A. Meyer. El Ginseng contiene una serie de sustancias activas llamadas ginsenósidos que son una clase de saponinas, glucósidos químicamente triterpenoides de la serie del damarano. Los ginsenósidos tienen propiedades adyuvantes y uno de los adyuvantes más activos es la fracción llamada Rb1. Se ha demostrado que la fracción Rb1 desencadena una respuesta inmunitaria Th1 y Th2 equilibrada según se determina midiendo los niveles de citoquinas IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10 secretadas post vacunación con una vacuna adyuvantada con Rb1. Además, el ginseng y la fracción Rb1 estimulan una intensa respuesta de anticuerpos específicos de antígeno.
- De acuerdo con un aspecto adecuado, la composición de vacuna es una vacuna que protege a mamíferos susceptible, adecuadamente caballos, contra la adenitis equina causada por *S. equi* a.
- La composición de vacuna de la presente divulgación se proporciona en una forma fisiológicamente administrable. Adecuadamente, es administrable mediante inoculación intramuscular, subcutánea, intradérmica o intranasal.
- Adecuadamente, la composición de vacuna de la presente divulgación estimula respuestas de anticuerpos séricos, mucosales y/o bronquiales dirigidos a antígenos de *S. equi* y/o *S. zooepidemicus* en mamíferos susceptibles a estas bacterias, adecuadamente caballos.
- También se desvela un método para producir un antígeno o inmunógeno que se usará en una composición antigénica o inmunógena de la presente invención, método que comprende las etapas de
- (a) proporcionar un fragmento de ADN que codifica dicho antígeno e introducir dicho fragmento en un vector de expresión;
 - (b) introducir dicho vector, que contiene dicho fragmento de ADN, en una célula hospedadora compatible;
 - (c) cultivar dicha célula hospedadora proporcionada en la etapa (b) en condiciones requeridas para la expresión del producto codificado por dicho fragmento de ADN; y
 - (d) aislar el producto expresado a partir de la célula hospedadora cultivada.
- Preferentemente, el método comprende además una etapa (e) en la que el producto aislado de la etapa (d) se purifica, por ejemplo mediante cromatografía por afinidad u otros métodos cromatográficos conocidos en la técnica.
- Por consiguiente, los antígenos de la presente divulgación se producen habitualmente de acuerdo con técnicas recombinantes.
- La presente divulgación se refiere a un método para a preparación de una vacuna de la presente invención, vacuna que contiene, como componente inmunizador, una composición antigénica o inmunógena tal como se ha desvelado anteriormente, comprendiendo dicho método mezclar dicha composición antigénica y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- La presente divulgación también se refiere a un método para la producción de un antisuero, comprendiendo dicho método administrar una preparación antigénica de la presente divulgación a un hospedador animal para producir anticuerpos en dicho hospedador animal y recuperar antisuero que contiene dichos anticuerpos producidos en dicho hospedador animal.
- La presente divulgación proporcionar una composición de vacuna que comprende uno o varios componentes antigénicos que han sido preparados de acuerdo con el presente método usando *E. coli* como células hospedadoras. La fuente de estos antígenos también podría ser las bacterias nativas, si se desarrollan métodos para expresión y purificación de las mismas. Como alternativa, los antígenos de la presente divulgación también pueden producirse de acuerdo con métodos que se basan en estrategias de fusión donde diversas partes del antígeno respectivo se recombinan, dando como resultado una proteína de fusión que consiste en partes de diferentes antígenos. Esta estrategia de fusión también podría ser adecuada para introducir una o varias partes reactivas inmunitarias, por ejemplo epítopos de células T o toxinas atenuadas (o partes de las mismas), introduciendo de este modo otras características adecuadas para optimizar la presentación o localización de antígenos.
- La presente divulgación también puede usarse en otras vacunas o composiciones inmunógenas de subunidad, donde la divulgación puede combinarse con uno o más inmunógenos, antígenos o epítopos seleccionados entre otros microorganismos o virus patógenos para formar composiciones o vacunas inmunógenas de subunidad multivalentes. Por ejemplo, en relación con los equinos, dicha composición o vacuna inmunógena de subunidad multivalente puede comprender al menos un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación y al menos un inmunógeno, antígeno o epítipo de WEEV, EEV, VEEV, virus de la gripe equina, EHV-1, EHV-4, EAV, WNV, tétano, *Rhodococcus*.

PARTE EXPERIMENTAL

Ejemplo 1. Amplificaciones por PCR y construcciones de clones de *E. coli*

5 La cepa de *S. equi* subespecie *equi* 1866 (obtenida de Nordvacc Läkemedel AB, Suecia), (WO 2004/032957 A1, Ref. 25) se usó como fuente de ADN para clonación. ADN cromosómico de la cepa de la subespecie *equi* 1866 se preparó y se usó como modelo para amplificar diversos fragmentos génicos presentados en los ejemplos 2-8 y 16 más adelante. Las secuencias de cebadores usados para amplificar los diversos fragmentos génicos se enumeran en las tablas 2, 4 y 5. Sitios de escisión para las enzimas de restricción se incluyeron en las secuencias de
 10 cebadores. El plásmido vector pGEX-6P-1 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) (como alternativa se usó el vector pTYB4, New England Biolabs) se usó para clonación y expresión. Las amplificaciones por PCR se realizaron usando los cebadores (20 pmol/μl) y la mezcla maestra para PCR Fidelity™ (USB Corporation, Cleveland, Ohio) usando el siguiente programa: etapa 1, pre-calentar 1 minuto a 95 °C, separación de la cadena de ADN; etapa 2, 30 segundos a 95 °C; etapa 3, hibridación 15 segundos a 5 grados por debajo del punto de fusión de la combinación de
 15 cebadores respectiva; y etapa 4, elongación durante 2 minutos a 72 °C, las etapas 2 - 4 se ejecutaron durante 26 ciclos. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1 %, y seguidamente se purificaron usando el kit QIAquick PCR Purification Kit™ (Qiagen). Después de escisión con las enzimas de restricción, los fragmentos se purificaron una vez adicional usando el mismo kit. Después de la purificación, los fragmentos se ligaron en el vector usando la T4ADN Ligasa ReadyToGo (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Después del ligamiento, las muestras
 20 respectivas se transformaron en células competentes de la cepa de *E. coli* TG1 usando electroporación, y se extendieron sobre placas LA-Amp (agar caldo de Luria-Bertani (15 g/l) suplementadas con ampicilina, conc. final 50 μg/ml) y se incubaron durante una noche a 37 °C. Al día siguiente, se recogieron colonias y se analizaron mediante PCR usando la combinación de cebadores respectiva. Se cultivaron clones con el inserto esperado y se prepararon plásmidos. La secuencia del inserto respectivo también se determinó mediante secuenciación de ADN. Los clones
 25 correctos se transformaron en células competentes de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLys para expresión de proteínas.

Tabla 2

Secuencias de cebadores 5'-3'

SEQ ID NO: 1. CneBam:	ggttgatccactaatcttagtgacaacatcac
SEQ ID NO: 2. CneSac:	TCCAGAGCTCCTTGACAGTAAAGCTGGTATAG
SEQ ID NO: 3. EagSac:	agtggagctcttagacgcagcaacagtg
SEQ ID NO: 4. EagXho:	CACCCTCGAGTTATTTGGCTTTGTTGATTAAGGTC
SEQ ID NO: 5. Eqc9:	cgtagagctctcggaacccaatccatc
SEQ ID NO: 6. Eqc10:	GAGGTCTAGAAGGACCTTGTGGCCATTT
SEQ ID NO: 7. Eqc11:	agcatctagattatctgtccgccagga
SEQ ID NO: 8. Eqc12:	GAGGCTGCAGTGGACCTCGGGTACCGCCTT
SEQ ID NO: 9. Eqc13:	agtactgcaggaccagccagcagcactaa
SEQ ID NO: 10. ScSac:	TGCAGAGCTCTGGCTTTTGGGCAGCTTCTTC
SEQ ID NO: 11. Eq8Bam:	catgggatccgcgactaccctagcaggac
SEQ ID NO: 12. Eq8Nco:	CTAGCCATGGGTGCTTAAGCTTTTCAATCTG
SEQ ID NO: 13. 85Nco:	agtaccatgggaaacgactactgctagtgc
SEQ ID NO: 14. Eq5C2:	CTGGCTCGAGTTATTTAGCAACCAAGGCTGC
SEQ ID NO: 15. IdEG1:	tactggatccgacgattaccaaggaatgctac
SEQ ID NO: 16. IdEG2:	TGATCTCGAGTTAGCTCAGTTTCTGCCATATG
SEQ ID NO: 17. Eq61p1:	gtcggatccgaggataaggttgcaactag
SEQ ID NO: 18. Eq61p6:	GCCTCTCGAGGGATAAGCTAGTCTGTCTTTGG
SEQ ID NO: 19. 54Sac:	ggcagagctcgatacagcaagctataccatcac
SEQ ID NO: 20. 54Xba:	TATTTCTAGAAGTTTTATAGGTGAAAACGATAACC

30 Ejemplo 2. Construcción de un clon que expresa la proteína de fusión Eq85

Un fragmento génico de *eq8* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores eq8Bam y eq8Nco. Después de la amplificación y la purificación, el fragmento se dirigió con BamHI y NcoI. Además, un fragmento génico de *eq5* se
 35 amplificó por PCR usando los pares de cebadores 85Nco y eq5C2. Después de la amplificación y la purificación, el fragmento se dirigió con NcoI y XhoI. Ambos fragmentos se ligaron en el vector escindido por BamHI y XhoI, pGEX-6P-1.

SEQ ID NO: 21. Que muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento de fusión génico que codifica Eq85 insertado en el vector pGEX-6P-1. Los sitios de BamHI y XhoI se indican en negrita y las secuencias del vector

ES 2 612 520 T3

están subrayadas. Nótese que el nucleótido A en **negrita y cursiva** es diferente en su posición en comparación con la secuencia publicada en http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_equi/;

TCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCGCGACTACCCTAGCAGGACAAACAGAAGTACGGGC
TGATAATATCTTACGCTTAGATATGACAGATAAAGAAGCAGTTGAAAAATTCGCTAACGA
GCTTAAAAATGAAGTCCATAAAAACTATCGTGGTAGTAATACTTGGCAAAGCTTACCCT
TATACTTAATGGTTATCAAAACCTTAGAGAACAAATAGAGACCGAGCTAAAAATAGTGA
ACAAAAGTAAAAGAGCTTAATGATAAGGTTAATAGTGAAACTCAAGGAAAACAAGAGTT
ACAGAATCAGCTTGAGAAAGAAAAAGAAGAGTTAGAAACACTAAAAAAGAGCTTGAAGC
TGAGAAGGCTAAAGGAACTGGAGAAACAGAGAAGCTTCAAAGGAAATTGAAGCAAAAA
TGCAATGATTTCTGACCTACAAAACAGCTTGAGGAAACTAAGCAAAGGGTTCAAGAGTT
TGAAGCTGAAGTAGGTAAATTAATGGCCGAAAAGGCAGACCTACAAACAAAATTAATGA
ACAAGAGCAGCTTAACGCTAAGCTTCAAAGAAATGAAGACTTAAAGGCTCAGATTGA
AAAGCTTAAGCACCCATGGGAAACGACTACTGCTAGTGCATTTGAAAATAATGGGACAGG
TCAACATCTGAACTGGCACATAGATATCCACAAGAATATACAGTTGAATTAGGAGAACC
AATTACTATCTCAGATCTTATGAGTCAAATTACGGTTACTCGTAAAGGTAGTAATGGGAC
TGTTAATGATGGAGATACTTTTGACTTTATTTGAAATGGAGATGGTTCAAGAGGAATTGA
TACCCCTGGAGTAAAAATATGGTTTGACTTTTACAATGCTGCGGGTACTTCCTTTTTAAC
TGATGAAATGTTAGCTTCGCCTACATATGCTGTACCGGGGGGATCTTATACTATTAAAGC
TTGGGTATTCTATGGGAAAAATGATACCAAAAAGCTCTTCACATTTAAACTAAAAATTC
CAACAGCAATAAACTGAGTTAAGGAAGTCGTTAGAGGAGGCTAAGCTAAACTCAGCCA
GCCTGAAGGAACGTATTCTGATGAATCACTGCAAGCCTTGCAATCAGCGGTTACT**A**TTGG
TAAGACCTATTTAAACAGTGACCCTGATCAAAATACAGTAGATCAATCTGTTACTACTAT
TGATTCCGCTATTACTAGTCTTGTTAATCTTAATGCTTTAAATGAAGCTATTAATCAAGC
TACACCTTTTATAACAGATGGCAAAGAGTATCCTAAAGAAGCGTATGACGGTCTTGTCGA
AAAGCTTGCAGCGGCAGCTAAGCTTCAAATTCATTTGGTCCTTCACAAGGAGATGTTGA
TAAGGCTGCGACTGATTTAACGCAAGCTCTTACGACGCTTAAGACTGCTGTAGCGCATGA
AGCCTTAGATCAAGCCTTGGCTAAGCTGTTAGAGCTTTACCGAGAAAAATCCAAATCTTGC
TTTGACATCAGAGTCTTTGAAGGAATTGTACAATAAGGCCATTGAAGCAGCAGGTACCTT
CTATAGAACTGTTAACAAGGATAAAGAGAGAAAAGACATTTCCCTTTATGAGCTAGAGCG
CTACACTACAGAAACAAATTCAGTTGTTGATACTATTTTAAAGGTAAAGGCTGCGATTGC
CGAAGAAGGAAAGGCAAATTCGCTTCTGCTTTAGACCAATTAATGCTCTTATCGGAGA
AAATCTAGACCTATCTCCATATACAGCAGCTTCTGCTCAAGCCTATAACAGACCAGCTAGC
TAAGGCTAAGGAGGTCGCAGCAGCGGGTGAGACAGCTTATGCTCAGGAGACAGAACCGAC
AGCTATTACTAACAGCTTGGTTAAGGTGTTAAATGCTAAGAAATCCCTCTCAGATGCCAA
GGCAGCCTTGGTTGCTAAATAA**CTCGAG**CGGCCGCATCGTG

5 SEQ ID NO: 22. Proteína de fusión Eq85. Los aminoácidos subrayados indican la secuencia que se origina a partir del vector. El * indica un sitio de escisión de proteasa tijera. Nótese que los aminoácidos en negrita se originan a partir del trabajo de construcción de la proteína de fusión y que estos aminoácidos podían estar cambiados o incluso ausentes si se usaba otra estrategia de fusión. Nótese que el aminoácido Ile (I) en negrita y cursiva en esta posición es diferente en comparación con la secuencia publicada en http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_equi/;

LEVL**FQ***GPLGSATTLAGQTEVRADN**ILRLD**MTDKEAVEK**FANELKNEV**HK**NYRGSNTWQK**
 LTLILNGYQNLREQIETELKNSEQKV**KELNDKVN**SETQ**GKQELQ**NQ**LEKEKEE**LETLKKE
 LEAEKAKGTGETEK**LQKEIEAK**NAMISDL**QKQLEETKQ**RVQEF**EAEV**GKLMAEKADLQTK
 LNEQEQLNAKLQKEI**EDLKAQIEK**LKH**PW**ETTTASAFENNGTGQHLN**WHIDIPQ**EYTV**EL**
 GEPITISDLMSQITVTRKGSNGTVNDGDT**FD**FI**SNGD**SGRGIDTPGVKI**WFD**FYNAAGTS
 FLTDEMLASPTYAVPGGSYTIKAWVFY**GKNDTKK**LFTFKLKNSNSNKTELRSLE**EAKLK**
 LSQPEGTYSD**ESLQALQ**SAVT**IG**KTYLNSDPDQNTVDQSVTTIDSAITSLVNLNALNEAI
 NQATPFITDGKEYPK**EAYDGLVQ**KLAA**AAKLQ**NSFGPSQGDVDKAATDLTQALTT**LKTAV**
 AHEALDQALAKLLELYRENPNLAL**TSESLK**ELYNKAIEAAGTFYRTVN**KDKERK**DISLYE
 LERYTTETNSVVD**TILKV**KAAIA**E**E**GKAK**LR**SALDQ**LNALIGENLDLSPYTAASAQAYTD
 QLAKAKEVAAAGETAYAQ**ETEPTAIT**NSLVKVLNAK**SLSDAKA**ALVAK

10 Ejemplo 3. Construcción de un clon que expresa la proteína de fusión CCE

Esta construcción de fusión génica está hecha de cinco fragmentos génicos de *S. equi* diferentes (*cne*, *eq21*, *eq36*, *eq42* y *eag*). En primer lugar, un fragmento génico de *cne* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores CneBam y CneSac. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con BamHI y SacI. En segundo lugar, un fragmento génico de *eag* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores EagSac y EagXho. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con SacI y Xho. Los fragmentos *cne* y *eag* purificados se ligaron en el vector escindido con BamHI y Xho, pGEX-6P-1. Después de la transformación en *E. coli*, un clon correcto se identificó y se indicó pCNEEAG. Seguidamente, un fragmento génico de *eq21* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores eqc9 y eqc10. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con SacI y XbaI. El fragmento génico de *eq36* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores eqc11 y eqc12. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con XbaI y PstI. El fragmento génico de *eq42* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores eqc13 y ScSac. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con PstI y SacI. Los tres fragmentos escindidos (*eq21*, *eq36* y *eq42*) se ligaron entre sí y se realizó una nueva PCR usando los pares de cebadores eqc9 y ScSac. El producto de PCR obtenido se escindió con SacI y se ligó en pCNEEAG escindido con SacI generando pCCE que alberga los fragmentos génicos en el siguiente orden *cne-eq21-eq36-eq42-eag*.

25 SEQ ID NO: 23. Que muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento de fusión génico de *cne-eq21-eq36-eq42-eag* insertado en el vector pGEX-6P-1. Los sitios de BamHI y Xho se indican en negrita y las secuencias del vector están subrayadas.

ES 2 612 520 T3

CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCACTAATCTTAGTGACAACATCACATCA
TTGACGGTTGCTTCTTCATCACTCCGAGATGGAGAGAGAACGACGGTAAAGGTTGCGTTT
GATGACAAAAACAGAAAATCAAGGCAGGGGATACGATAGAGGTCACCTGGCCTACAAGT
GGTAATGTCTACATTCAGGGCTTTAATAAAACCATAACCGCTTAATATTAGAGGGGTAGAT
GTTGGTACCTTGGAGGTCACGCTAGACAAGGCTGTTTTACATTCAATCAAAATATTGAA
ACAATGCATGATGTCTCTGGTTGGGGAGAGTTTGATATTACTGTTAGAAATGTGACACAA
ACCACCGCTGAAACATCAGGAACGACCACAGTAAAGGTAGGCAATCGCACTGCTACTATC
ACTGTTACTAAGCCTGAGGCAGGCACTGGTACCAGCTCATTTTATTATAAGACTGGTGAT
ATGCAGCCCAATGATACTGAGCGTGTGAGATGGTTCCTGCTGATTAACAACAACAAGGAA
TGGGTGGCCAATACTGTTACAGTCGAAGACGATATTCAAGGTGGTCAAACCTTGGATATG
AGCAGCTTTGACATCACCGTATCTGGTTATCGTAACGAGCGCTTCGTTGGGGAAAACGCT
CTGACAGAGTTTCATACAACATTTCCAAATTCTGTCATTACGGCAACAGATAATCACATT
AGTGTGCGGTTAGATCAATATGATGCCTCACAAAACACTGTCAACATTGCTTATAAGACA
AAGATAACGGACTTTGACCAAAAAGAATTTGCCAACAACAGTAAAATCTGGTACCAGATT
TTATACAAGGATCAGGTATCGGGTCAAGAGTCAAACCACCAAGTAGCCAATATCAATGCT
AACGGCGGGGTTGATGGCAGTCGCTATACCAGCTTTACTGTCAAGGAGCTCTCGGAACCC
AATCCATATCCAGATGTGAGGCGTTTCCTTGATGAGAAGTACGATGGAGATGTGGATAAA
TTATCTAAACAACCTCAAGGTTATTTTGGTAGTTAAGAGAGTATATAGAGTTTGAACCT
AAAAATGGCAAACAAGGTCCTTCTAGATTATCTGGTCCGCCAGGATACCCACTTACTCGT
GATTTCTCCCGTAACTTCCTAGAAGAAAATACTGCAAAATATTTAGATCAATTAAGAGAA
CATCTACAGCACAGATTTAGTGAACCTGAGAGCTTAACAAGAAAATTAGAGAAAGAAGGC
GGTACCCGAGGTCCACTGCAGGACCAGCCAGCAGCACTAAAATATCCAGAACCTAGAGAC
TATTTTCTTCATACTCGTGAAGGTGATGTTATTTATGATGAGGATATAAAAAGATATTTT
GAGGATTTAGAAGCCTATTTAACAGCTAGACTTGGTGGGATTGATAAAAAAGTAGAAGAA
GCTGCCCAAAGCCAGAGCTCTTAGACGCAGCAACAGTGTAGAGCCTACAACAGCCTTC
ATTAGAGAAGCTGTTAGGGAAATCAATCAGCTGAGTGATGACTACGCTGACAATCAAGAG
CTTCAGGCTGTTCTTGCTAATGCTGGAGTTGAGGCACTTGCTGCAGATACTGTTGATCAG
GCTAAAGCAGCTCTTGACAAAGCAAAGGCAGCTGTTGCTGGTGTTGAGCTTGTATGAAGCA
AGACGTGAGGCTTACAGAACAATCAATGCCTTAAGTGATCAGCACAAAAGCGATCAAAAG
GTTGAGCTAGCTCTAGTTGCTGCAGCAGCTAAGGTGGCAGATGCTGCTTCAGTTGATCAA
GTGAATGCAGCCATTAATGATGCTCATAACAGCTATTGCGGACATTACAGGAGCAGCCTTG
TTGGAGGCTAAAGAAGCTGCTATCAATGAACTAAAGCAGTATGGCATTAGTGATTACTAT
GTGACCTTAATCAACAAAGCCAAATAA**CTCGAGCGGCCGCAT**

SEQ ID NO: 24. Proteína de fusión de CCE. Los aminoácidos subrayados indican la secuencia que se origina a partir del vector. El * indica un sitio de escisión de proteasa tijera. Nótese que los aminoácidos en negrita se originan

a partir del trabajo de construcción de la proteína de fusión y que estos aminoácidos podían estar cambiados o incluso ausentes si se usaba otra estrategia de fusión.

LEVLFQ*GPLGSTNLSDNITSLTVASSSLRDGERTTVKVAFDKQKIKAGDTIEVTWPTS
 GNVYIQGFNKTIPLNIRGVDVGTLEVTLDKAVFTFNQNIETMHDVSGWGEFDITVRNVTQ
 TTAETSGTTTTVKVGNRTATIITVTKPEAGTGTSSFYKYGDMQPNTERVRFLLINNNKE
 WVANTVTVEDDIQGGQTLDMSSFDITVSGYRNERFVGENALTEFHTTFPNSVITATDNHI
 SVRLDQYDASQNTVNIAYKTKITDFDQKEFANNSKIWYQILYKDQVSGQESNHQVANINA
 NGGVDGSRYTSFTVK**EL**SEPNPYPDVRRFLDEKYDGDVDKLSKQLQGYFGSLREYIEFEL
 KNGKQGP**SRL**SGPPGYPLTRDFSRNFLEENTAKYLDQLREHLQHRFSELESLTRKLEKEG
 GTRG**PLQD**QPAALKYPEPRDYFLHTREGDVIYDEDIKRYFEDLEAYLTARLGGIDKKVEE
 AAQKP**ELL**DAATVLEPTTAFIREAVREINQLSDDYADNQELQAVLANAGVEALAADTVDQ
 AKAALDKAKAAVAGVQLDEARREAYRTINALSDQHKSQKVLALVAAAQVADAASVDQ
 VNAAINDAHTAIADITGAALLEAKEAAINELKQYGISDYVVTLINKAK

5

Ejemplo 4. Construcción de un clon que expresa IdeE

Un fragmento génico del gen *ideE* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores IdEG1 e IdEG2. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con BamHI y XhoI y se ligó en el vector escindido con BamHI y XhoI pGEX-6P-1.

10

SEQ ID NO: 25. La secuencia de nucleótidos del gen *ideE* insertada en el vector pGEX-6P-1. Los sitios de BamHI y XhoI se indican en negrita y las secuencias del vector están subrayadas.

CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTG**GGATCC**GACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAA
 GCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCA
 CTAACACCCGAGCAGTTTTCGATATAATAACGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCT
 CATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGC
 GCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAAAAATAAACAGAGATTGAA
 GCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAATCATTTTTAACAACCAAGAGCTATTT
 GATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTAATTAT
 TTTAGAGATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGTTATGCCTGATCTT
 GTTCTAGACATGTTTATCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGAT
 GTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACC
 AGAGGAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAATAAAGGACTAAAT
 GACATCAGCACCATATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACAT
 ACCTACGCCAATGTTAGCATTAGCCATGTGATTAACCTTGTGGGAGCTGATTTAATGCT
 GAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATG
 AAAAAATATTTTGTGCGCATTAATGCTCATAGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAATA
 GAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGAC
 ATATGGCAGAACTGAGCTAA**CTCGAGCGGCCGCAT**

SEQ ID NO: 26. Proteína IdeE. Los aminoácidos subrayados indican la secuencia que se origina a partir del vector. El * indica un sitio de escisión de proteasa tijera.

LEVLFQ*GPLGSDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLA
 HQGWYDITKAFDGDNDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELF
 DLKAAIDTKDSQTNSQLFNFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTD
 VNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSH
 TYANVSI SHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHRHVAISAKKI
 EGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

5

Ejemplo 5. Construcción de un clon que expresa la proteína de fusión CNEEAG

Un fragmento génico de *cne* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores CneBam y CneSac. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con BamHI y SacI. También el fragmento génico de *eag* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores EagSac y EagXho. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con SacI y XhoI. Ambos fragmentos se ligaron en el vector escindido con BamHI y XhoI pGEX-6P-1.

10

SEQ ID NO: 27. Que muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento de fusión génico *cne-eag* que codifica CNEEAG insertado en el vector pGEX-6P-1. Los sitios de BamHI y XhoI se indican en negrita y las secuencias del vector están subrayadas.

15

CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCACTAATCTTAGTGACAACATCACATCA
 TTGACGGTTGCTTCTTCATCACTCCGAGATGGAGAGAGAACGACGGTAAAGGTTGCGTTT
 GATGACAAAAACAGAAAATCAAGGCAGGGGATACGATAGAGGTCACCTGGCCTACAAGT
 GGTAATGTCTACATTCAGGGCTTTAATAAAACCATAACCGCTTAATATTAGAGGGGTAGAT
 GTTGGTACCTTGGAGGTCACGCTAGACAAGGCTGTTTTTACATTCAATCAAAATATTGAA
 ACAATGCATGATGTCTCTGGTTGGGGAGAGTTTGATATTACTGTTAGAAATGTGACACAA

ES 2 612 520 T3

ACCACCGCTGAAACATCAGGAACGACCACAGTAAAGGTAGGCAATCGCACTGCTACTATC
ACTGTTACTAAGCCTGAGGCAGGCACTGGTACCAGCTCATTTTATTATAAGACTGGTGAT
ATGCAGCCCAATGATACTGAGCGTGTGAGATGGTTCCTGCTGATTAACAACAACAAGGAA
TGGGTGGCCAATACTGTTACAGTCGAAGACGATATTCAAGGTGGTCAAACCTTGGATATG
AGCAGCTTTGACATCACCGTATCTGGTTATCGTAACGAGCGCTTCGTTGGGGAAAACGCT
CTGACAGAGTTTCATACAACATTTCCAAATTCTGTCATTACGGCAACAGATAATCACATT
AGTGTGCGGTTAGATCAATATGATGCCTCACAAAACACTGTCAACATTGCTTATAAGACA
AAGATAACGGACTTTGACCAAAAAGAATTTGCCAACAACAGTAAAATCTGGTACCAGATT
TTATAACAAGGATCAGGTATCGGGTCAAGAGTCAAACCACCAAGTAGCCAATATCAATGCT
AACGGCGGGGTTGATGGCAGTCGCTATAACCAGCTTTACTGTCAAGGAGCTCTTAGACGCA
GCAACAGTGTTAGAGCCTACAACAGCCTTCATTAGAGAAGCTGTTAGGGAAATCAATCAG
CTGAGTGATGACTACGCTGACAATCAAGAGCTTCAGGCTGTTCTTGCTAATGCTGGAGTT
GAGGCACTTGCTGCAGATACTGTTGATCAGGCTAAAGCAGCTCTTGACAAAGCAAAGGCA
GCTGTTGCTGGTGTTCAGCTTGATGAAGCAAGACGTGAGGCTTACAGAACAATCAATGCC
TTAAGTGATCAGCACAAAAGCGATCAAAGGTTTCAGCTAGCTCTAGTTGCTGCAGCAGCT
AAGGTGGCAGATGCTGCTTCAGTTGATCAAGTGAATGCAGCCATTAATGATGCTCATAACA
GCTATTGCGGACATTACAGGAGCAGCCTTGTGGAGGCTAAAGAAGCTGCTATCAATGAA
CTAAAGCAGTATGGCATTAGTGATTACTATGTGACCTTAATCAACAAAGCCAAATAACTC
GAGCGGCCGCAT

5 **SEQ ID NO: 28. Proteína de fusión CNEEAG.** Los aminoácidos subrayados indican la secuencia que se origina a partir del vector. El * indica un sitio de escisión de proteasa tijera. Nótese que los aminoácidos en negrita se originan a partir del trabajo de construcción de la proteína de fusión y que estos aminoácidos podían estar cambiados o incluso ausentes si se usaba otra estrategia de fusión.

LEVLFQ*GPLGSTNLSDNITSLTVASSSLRDGERTTVKVAFFDDKKQKIKAGDTIEVTWPTS
GNVYIQGFNKTIPLNIRGVDVGTLEVTLDKAVFTFNQNIETMHDVSGWGEFDITVRNVQT
TTAETSGTTTTVKVGNRTATITVTKPEAGTGTSSFFYYKTGDMQPNDTERVRWFL LINNKE
WVANTVTVEDDIQGGQTLDMSSFIDITVSGYRNERFVGENALTEFHTTFPNSVITATDNHI
SVRLDQYDASQNTVNIAYKTKITDFDQKEFANNSKIWYQILYKDQVSGQESNHQVANINA
NGGVDGSRYTSFTVKE**EL**LLDAATVLEPTTAFIREAVREINQLSDDYADNQELQAVLANAGV
EALAADTVDQAKAALDKAKAAVAGVQLDEARREAYRTINALSDQHKSQKQVQLALVAAAA
KVADAASVDQVNAAINDAHTAIADITGAALLEAKEEAANELKQYGISDYVTLINKAK

10 Ejemplo 6. Construcción de un clon que expresa la proteína de fusión IE5

15 Un fragmento génico del gen *ideE* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores IdEG1 e IENco. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con BamHI y NcoI. También el fragmento génico de *eq5* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores 85Nco y eq5C2. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con NcoI y XhoI. Ambos fragmentos se ligaron en el vector escindido con BamHI y XhoI pGEX-6P-1.

ES 2 612 520 T3

SEQ ID NO: 29. La secuencia de nucleótidos de la fusión *ideE-eq5* insertada en el vector pGEX-6P-1. Los sitios de BamHI y XhoI se indican en negrita y las secuencias del vector están subrayadas.

CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTG**GGATCC**GACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAA
GCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCA
CTAACACCCGAGCAGTTTTCGATATAATAACGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCT
CATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGC
GCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTGGTGGTTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAA
GCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAATCATTTTTAACAACCAAGAGCTATTT
GATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTAATTAT
TTTAGAGATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTT
GTTCTAGACATGTTTATCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGAT
GTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACC
AGAGGAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAATAAAGGACTAAAT
GACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACAT
ACCTACGCCAATGTTAGCATTAGCCATGTGATTAACCTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCT
GAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATG
AAAAATATTTTTGTCGGCATTAAATGCTCATAGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAATA
GAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGAC
ATATGGCAGAACTGAGCCCATGGGAAACGACTACTGCTAGTGCATTTGAAAATAATGGG
ACAGGTCAACATCTGAACTGGCACATAGATATTCACAAGAATATACAGTTGAATTAGGA
GAACCAATTACTATCTCAGATCTTATGAGTCAAATTACGGTTACTCGTAAAGGTAGTAAT
GGGACTGTTAATGATGGAGATACTTTTGACTTTATTTTCAATGGAGATGGTTCAAGAGGA
ATTGATACCCCTGGAGTAAAAATATGGTTTGACTTTTACAATGCTGCGGGTACTTCCTTT
TTAACTGATGAAATGTTAGCTTCGCCTACATATGCTGTACCGGGGGATCTTATACTATT
AAAGCTTGGGTATTCTATGGGAAAAATGATACCAAAAAGCTCTTCACATTTAAACTAAAA
AATCCAACAGCAATAAACTGAGTTAAGGAAGTCGTTAGAGGAGGCTAAGCTAAAACCTC

ES 2 612 520 T3

AGCCAGCCTGAAGGAACGTATTCTGATGAATCACTGCAAGCCTTGCAATCAGCGGTTACT
ATTGGTAAGACCTATTTAAACAGTGACCCTGATCAAAATACAGTAGATCAATCTGTTACT
ACTATTGATTCCGCTATTACTAGTCTTGTTAATCTTAATGCTTTAAATGAAGCTATTAAT
CAAGCTACACCTTTTATAACAGATGGCAAAGAGTATCCTAAAGAAGCGTATGACGGTCTT
GTGCAAAAGCTTGCAGCGGCAGCTAAGCTTCAAATTCATTTGGTCCTTCACAAGGAGAT
GTTGATAAGGCTGCGACTGATTTAACGCAAGCTCTTACGACGCTTAAGACTGCTGTAGCG
CATGAAGCCTTAGATCAAGCCTTGGCTAAGCTGTTAGAGCTTTACCGAGAAAATCCAAAT
CTTGCTTTGACATCAGAGTCTTTGAAGGAATTGTACAATAAGGCCATTGAAGCAGCAGGT
ACCTTCTATAGAAGTGTAAACAAGGATAAAGAGAGAAAAGACATTTCCCTTTATGAGCTA
GAGCGCTACACTACAGAAACAAATTCAGTTGTTGATACTATTTTAAAGGTAAAGGCTGCG
ATTGCCGAAGAAGGAAAGGCAAAATTCGCTTCTGCTTTAGACCAATTAATGCTCTTATC
GGAGAAAATCTAGACCTATCTCCATATACAGCAGCTTCTGCTCAAGCCTATACAGACCAG
CTAGCTAAGGCTAAGGAGGTCGCAGCAGCGGGTGAGACAGCTTATGCTCAGGAGACAGAA
CCGACAGCTATTACTAACAGCTTGGTTAAGGTGTTAAATGCTAAGAAATCCCTCTCAGAT
GCCAAGGCAGCCTTGGTTGCTAAATAA**CTCGAGCGGCCGCAT**

5 SEQ ID NO: 30. Proteína de fusión IE5. Los aminoácidos subrayados indican la secuencia que se origina a partir del vector. El * indica un sitio de escisión de proteasa tijera. Nótese que los aminoácidos en negrita se originan a partir del trabajo de construcción de la proteína de fusión y que estos aminoácidos podían estar cambiados o incluso ausentes si se usaba otra estrategia de fusión. Nótese que el aminoácido lle (l) en negrita y cursiva en esta posición es diferente en comparación con la secuencia publicada en http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_equil/;

LEVL**FQ***GPLGSDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLA
HQGWYDITKAFDGDNDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELF
DLKAAIDTKDSQTNSQLFNFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTD
VNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNGKLNDISTIIKQELTEGRALALSH
TYANVSI SHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINHRHVAISAKKI
EGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS***PW***ETTTASAFENNGTGQHLNWHIDIPQEYTVELG
EPITISDLMSQITVTRKGSNGTVNDGDTDFDISNGDGSRGIDTPGVKIWFDFYNAAGTSF
LTDEMLASPTYAVPGGSYTIKAWVFYKNDTKKLF~~TF~~KLKNSNSNKTELRSLEEAKLKL
SQPEGTYSDESLQALQSAVT***IG***KTYLNSDPDQNTVDQSVTTIDSATSLVNLNALNEAIN
QATPFI TDGKEYPKEAYDGLVQKLA~~AA~~AKLQNSFGPSQGDVDKAATDLTQALTTLKTAVA
HEALDQALAKLLELYRENPNLALTSESLKELYNKAIEAAGTFYRTVNKDKERKDISLYEL
ERYTTETNSVVDTIILKVKAIAEEGKAKLRSALDQLNALIGENLDLSPYTAASAQAYTDQ
LAKAKEVAAAGETAYAQETEPTAITNSLVKVLNAKKSLSDAKAAALVAK

ES 2 612 520 T3

Ejemplo 7. Construcción de un clon que expresa EndoSe

Un fragmento génico del gen *endoSe* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores eq61p1 y eq61p6. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con BamHI y XhoI y se ligó en el vector escindido con BamHI y XhoI pGEX-6P-1.

5 SEQ ID NO: 31. La secuencia de nucleótidos del gen *endoSe* insertada en el vector pGEX-6P-1. Los sitios de BamHI y XhoI se indican en negrita y las secuencias del vector están subrayadas.

```
CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCGAGGATAAGGTTGTGCAAACACTAGTCCA
TCAGTCTCTGCTATTGATGACCTACATTACCTGTCTGGAAAACAGTAAAAAGAATTTAAG
GAGGGGTTATCAAAGGCAGGAGAAGTACCTGAAAAGCTAAAGGATATTTTATCCAAGGCA
CAGCAGGCAGATAAGCAGGCAAAGGTTCTTGCAGAAATGAAGGTTCTGAAAAATAGCC
ATGAAGCCTTTAAAGGGGCCTCTTTATGGTGGCTATTTTAGGACTTGGCATGATAAAACA
TCAGATCCGGCTGAAAAGGATAAGGTTAATTCTATGGGAGAATTGCCTAAGGAGGTTGAC
TTAGCCTTTGTTTTCCATGATTGGACCAAGGATTATAGCTTTTTCTGGCAAGAATTGGCG
ACCAAGCATGTGCCAACGCTGAACAAGCAGGGAACACGTGTGATTTCGTACCATTCCATGG
CGTTTCCTTGCAGGCGGTGATCATAGTGGTATTGCTGAAGATACGAAAAATACCCAAAT
ACTCCAGAGGGAAATAAGGCCTTGGCAAAGGCTATTGTAGATGAATACGTTTATAAATAT
AATCTTGATGGTTTAGATGTTGATATTGAGCGGGATAGCATTCCAAAAGTAAATGGAAAA
GAGAGTAACGAAAATATTCAGCGCTCTATTGCTGTTTTTGAAGAAATTGGCAAGCTTATT
GGGCCAAAGGGCGCTGACAAGTCACGTTTGTTCATTATGGATAGCACCTACATGGCTGAC
AAGAACCCATTGATTGAGCGCGGTGCCCAATATATTGATTTGCTGCTTGTGCAGGTTTAT
GGCACTCAAGGTGAGAAGGGAGATTGGGATCCAGTCGCTAGAAAACCTGAAAAGACAATG
GAGGAACGTTGGGAATCGTATAGCAAATACATTCTCCTGAGCAGTACATGGTTGGTTTT
TCTTTCTATGAGGAATATGCGGGCAGTGGTAACCTCTGGTATGATATTAATGAGAGGAAA
GATGATCATAATCCGTAAATTCAGAGATAGCTGGTACTCGTGCTGAGCGTTATGCAAAA
TGGCAGCCTAAGACAGGTGGTGTCAAGGGAGGGATTTTCTCTTATGCGATTGATCGCGAT
GGTGTAGCGCATCAACCTAAAAAAGTCTCAGATGATGAGAAAAGAACTAACAAGGCTATA
AAGGATATAACAGATGGTATTGTCAAATCAGATTATAAGGTTTCTAAGGCCTTGAAGAAG
GTTATGGAAAATGACAAATCCTATGAGCTGATTGATCAGAAAGATTTTCCAGACAAGGCT
TTGCGAGAAGCAGTTATTGCACAGGTTGGAAGCAGAAGAGGGGATTTAGAGCGGTTCAAT
GGAACCCTGCGCTTAGACAATCCGGATATCAAGAGTTTAGAAGGCCTGAATAAGCTTAAA
```

ES 2 612 520 T3

AAACTAGCTAAGCTAGAGCTAATCGGTCTATCACAAATCACAAAGCTGGATAGCTTAGTC
CTACCTGCAAATGCTAAGCCGACCAAGGATACGCTGGCCAATGTTCTTGAAGCCTACGAC
AGCGCTAAGAAGGAAGAGACTAAGGCGATTCCACAGGTGGCTCTGACCATTTCTGGTCTA
ACTGGCTTGAAGGAATTAATCTTGCTGGCTTTGATCGTGATAGCTTGGCTGGAATTGAC
GCAGCTAGCCTAACCTCTCTTGAAAAGGTGGATCTCTCTAGTAATAAGCTGGACTTAGCA
GCTGGTACGGAAAATCGTCAGATTCTTGATAACCATGCTGGCAACAGTACTAAGCATGGC
GGTGTTAGCGAAAAGACGTTTGTATTTGATCATCAAAAGCCTACTGGTCTTTATCCTGAT
ACTTATGGCACTAAGAGCCTTCAGTTACCAGTAGCAAATGATACAATTGATTTGCAGGCT
AAGCTTTTATTTGGAACAGTTACCAATCAGGGCACGCTAATCAATAGCGAAGCTGACTAT
AAGGCTTATCAGGAGCAGGAAATAGCAGGTCACCGTTTTTGTGATTCAAGCTATGATTAC
AAAGCCTTTGCAGTGACCTACAAGGACTATAAGATCAAGGTGACTGACTCAACCTTAGGT
GTCACTGATCACAAGGACTTATCCACTAGCAAGGAGGAGACCTACAAGGTTGAATTCTTT
AGCCCTACTAATAGCACTAAGCCTGTGCATGAGGCTAAGGTTGTCGTTGGTGC GGAAAAA
ACCATGATGGTTAACCTAGCAGAGGGAGCAACTGTGATTGGTGGTGATGCAGATCCAACA
AATGCAAAAAAAGTGTTTGTGATGGTTTGTCTAATAATGATACAACAATTCTGTCAACTAGC
AATAAAGCTTCTATCATTTTTGAACTTAAAGAGCCTGGCTTAGTCAAGTATTGGCGTTTC
TTAATGACAGCAAAATTAGTAAAGCTGACTGTATTAAGGAGGCCAAGCTTGAAGCCTTT
GTTGGCCATCTTGAAGCTGGCTCAAAGGTAAAGGATAGCTTGGAAAAATCATCAAAATGG
GTAACAGTTTCAGATTATTCAGGAGAGGACCAAGAGTTTAGCCAGCCGTTAAACAACATT
GGTGCCAAATATTGGAGAATAACAGTTGATACTAAGGGAGGACGTTACAATTGGCCATCA
CTTCCTGAGCTTCAAATCATTGGTTATCAATTACCGGCTGCGGATCTTGTGATGGCAATG
CTAGCTACTGCAGAGGAGCTATCTCAGCAAAAAGACAAGTTCTCTCAAGAGCAGCTTAAG
GAGCTCGAAGTCAAAATAGCTGCCTTAAAGGCTGCTTTAGATAGTAAGATGTTTAATGCC
GATGCTATTAACGCTAGTACTGCTGATCTGAAGGCTTATGTTGATAAGCTTTTAGCTGAT
AGAACTGATCAGGAAAAAGTAGCTAAAGCAGCTAAAGTTGAGCAGCCTGTGGCTACTGAC
ATAAAAGAAAATACTGAGCCAGAAAATCCAAAGACAGACTAGCTTATCC**CTCGAGCGGCC**
GCAT

5 SEQ ID NO: 32. Proteína EndoSe. Los aminoácidos subrayados indican la secuencia que se origina a partir del vector. El * indica a sitio de escisión de proteasa tijera. Nótese que el aminoácido Y en negrita y cursiva es diferente en su posición en comparación con la secuencia publicada en http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_equi/;

LEVLFQ*GPLGSEDKVVQTS^{PSVSAIDDLHYL}SENSKKEFKEGLSKAGEVPEKLDILSKA
QQADKQAKVLAEMKVPEKIAMKPLKGPLYGGYFR^{TWHDK}TS^{DP}AEKDKVNSMGELPKEVD
LAFVFDWTKDYSFFWQELATKHVPTLNKQ^GTRVIRTIPWRFLAGGDHSGIAEDTQKYPN

ES 2 612 520 T3

TPEGNKALAKAIVDEYVYKYNLDGLDVDIERDSIPKVNKESNENIQRSIAVFEEIGKLI
GPKGADKSRLFIMDSTYMADKNPLIERGAQYIDLILLVQVYGTQGEKGDWDPVARKPEKTM
EERWESYSKYIRPEQYMVGFSFYEE**Y**AGSGNLWYDINERKDDHNPLNSEIAGTRAERYAK
WQPKTGGVKGGIFSAYAIDRDGVAHQPKKVSDDDEKRTNKAIKDITDGIVKSDYKVSALKK
VMENDKSYELIDQKDFPDKALREAVIAQVGSRRGDLERFNGTLRLDNPDIKSLEGLNKLK
KLAKLELIGLSQITKLDSLVL PANAKPTKDTLANVLEAYDSAKKEETKAIPQVALTISGL
TGLKELNLAGFDRDSLALGIDAASLTSLEKVDLSSNKLDLAAGTENRQILD TMLATVTKHG
GVSEKTFVFDHQPTGLYPDTYGTKSLQLPVANDTIDLQAKLLFGTVTNQGTLINSEADY
KAYQEQEIAGHRFVDSYDYKAFVAVTYKDYKIKVTDSTLGVTDHKDLSTSKEETYKVEFF
SPTNSTKPVHEAKVVVGAEKTMMVNLAEGATVIGGDADPTNAKKVFDGLLNNDTTILSTS
NKASIIIFELKEPGLVKYWRFFNDSKISKADCIKEAKLEAFVGHLEAGSKVKDSLEKSSKW
VTVSDYSGEDQEF SQPLNNIGAKYWRITVDTKGGRYNWPSLPELQIIGYQLPAADLVMAM
LATAEELSQQKDKFSQEQLKELEVKIAALKAALDSKMFNADAINASTADLKAYVDKLLAD
RTDQEKVAKAAKVEQP VATDIKENTEPENPKTD

Ejemplo 8. Construcción de un clon que expresa la proteína de fusión CPCE

- 5 Esta construcción de fusión génica está compuesta por cinco fragmentos génicos de *S. equi* diferentes (*cne*, *eq54*, *eq36*, *eq42* y *eag*). El fragmento génico de *eq54* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores 54Sac y 54XbaI. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con SacI y XbaI. El fragmento *eq36-eq42* se obtuvo mediante PCR usando los pares de cebadores eqc11 y ScSac con el ADN de la construcción CCE como modelo. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con SacI y XbaI. Los dos fragmentos de ADN escindidos se ligaron en la construcción CNEEAG escindida previamente con SacI, generando un clon que
- 10 alberga los fragmentos génicos en el siguiente orden *cne-eq54-eq36-eq42-eag*.
SEQ ID NO: 33. Que muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento de fusión génico de *cne-eq54-eq36-eq42-eag* insertada en el vector pGEX-6P-1. Los sitios de BamHI y XhoI se indican en negrita y las secuencias del vector están subrayadas.

15 CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTG**GGATCC**ACTAATCTTAGTGACAACATCACATCA
TTGACGGTTGCTTCTTCATCACTCCGAGATGGAGAGAGAACGACGGTAAAGGTTGCGTTT
GATGACAAAAACAGAAAATCAAGGCAGGGGATACGATAGAGGTCACCTGGCCTACAAGT
GGTAATGTCTACATTCAGGGCTTTAATAAAACCATAACCGCTTAATATTAGAGGGGTAGAT
GTTGGTACCTTGGAGGTCACGCTAGACAAGGCTGTTTTACATTCAATCAAAATATTGAA

ES 2 612 520 T3

ACAATGCATGATGTCTCTGGTTGGGGAGAGTTTGATATTACTGTTAGAAATGTGACACAA
ACCACCGCTGAAACATCAGGAACGACCACAGTAAAGGTAGGCAATCGCACTGCTACTATC
ACTGTTACTAAGCCTGAGGCAGGCACTGGTACCAGCTCATTTTATTATAAGACTGGTGAT
ATGCAGCCCAATGATACTGAGCGTGTGAGATGGTTCCTGCTGATTAACAACAACAAGGAA
TGGGTGGCCAATACTGTTACAGTCGAAGACGATATTCAAGGTGGTCAAACCTTGGATATG
AGCAGCTTTGACATCACCGTATCTGGTTATCGTAACGAGCGCTTCGTTGGGGAAAACGCT
CTGACAGAGTTTCATACAACATTTCCAAATTCTGTCATTACGGCAACAGATAATCACATT
AGTGTGCGGTTAGATCAATATGATGCCTCACAAAACACTGTCAACATTGCTTATAAGACA
AAGATAACGGACTTTGACCAAAAAGAATTTGCCAACAACAGTAAAATCTGGTACCAGATT
TTATAACAAGGATCAGGTATCGGGTCAAGAGTCAAACCACCAAGTAGCCAATATCAATGCT
AACGGCGGGGTTGATGGCAGTCGCTATAACCAGCTTTACTGTCAAGGAGCTCGATACAGCA
AGCTATACCATCACTGTTGAGGGAGCTACAGCAGGTCACACCTATGAGGCTTATCAGATT
TTCAAGGGTGACTTGTTTTGACAGTACCCTATCAAACATCACATGGGGAGGTGGTGTTACA
CCTTTTGAATTTGATGGTTCAAAAAGACGCTGCTAAGATTGCAGAGGGATTGAAGGAAGCA
AATGCAGCTGCCTTTGCCAAGGAAGCAGGTAAGCACTTGACAGCAACCATTGCAGGAACA
GGAACACATGCAATCACCGTTAACGAGGCTGGTACTACCTCATCAAGGACAAAAATGAT
TCTCAAACAGGCAAGCATGACGCCTACACCTCATTTGTCCTGAAGGTTGTTAAAAACACC
AGCTTCAAACCAAAATCTGCTATCCCAACAGTCCTTAAAAAGGTCAAGGACCGTAATGAC
AAGACAGGTCTTGAGACAGGCTGGCAAGATTCAGCTGACTATGACAAAAATGACAAGGTG
CCATTCCAGCTAACCGCAACCCCTACCGTCAAATTACGATGCCTTTCAAGAATACTACCTT
GAATTTGTAGATACCTTATCAAAAAGGGCTAAGCTACAACAAAGACGCCAAGGTCTATGTG
GTTAATGGAGATACTCGTCAAGATATTACTAATTCATTTACAGTTAGTGAAGATGGTTCA
TCTTTTAAAATCAATAACCTAAAGGCTGTTTCAGGGAGTAACAATAACAGCTACCAGTAAG
ATCGTTGTGAATACACTGCTACCCTCAATGACCAAGCGGCCATCGGCAAAAAAGGAAAT
CAAACGAAGTTGCTTTGAAATACTCAAACGATCAAACGCTCTTGAAAAAGGAGAGGAG
TCTCCAAAAGGGGAGACACCAAAAAGACAAGGTTATCGTTTTTCACCTATAAACTTCTAGA
TTATCTGGTCCGCCAGGATACCCACTTACTCGTGATTTCTCCCGTAACTTCTTAGAAGAA
AATACTGCAAAATATTTAGATCAATTAAGAGAACATCTACAGCACAGATTTAGTGAACCT
GAGAGCTTAACAAGAAAATTAGAGAAAGAAGGCGGTACCCGAGGTCCACTGCAGGACCAG
CCAGCAGCACTAAAATATCCAGAACCTAGAGACTATTTTCTTCATACTCGTGAAGGTGAT
GTTATTTATGATGAGGATATAAAAAGATATTTTGAGGATTTAGAAGCCTATTTAACAGCT
AGACTTGGTGGGATTGATAAAAAAGTAGAAGAAGCTGCCCAAAAGCCAGAGCTCTTAGAC
GCAGCAACAGTGTTAGAGCCTACAACAGCCTTCATTAGAGAAGCTGTTAGGGAAAATCAAT
CAGCTGAGTGATGACTACGCTGACAATCAAGAGCTTCAGGCTGTTCTTGCTAATGCTGGA
GTTGAGGCACTTGTGCAGATACTGTTGATCAGGCTAAAGCAGCTCTTGACAAAAGCAAAG
GCAGCTGTTGCTGGTGTTCAGCTTGATGAAGCAAGACGTGAGGCTTACAGAACAATCAAT

GCCTTAAGTGATCAGCACAAAAGCGATCAAAGGTTTCAGCTAGCTCTAGTTGCTGCAGCA
 GCTAAGGTGGCAGATGCTGCTTCAGTTGATCAAGTGAATGCAGCCATTAATGATGCTCAT
 ACAGCTATTGCGGACATTACAGGAGCAGCCTTGTGGAGGCTAAAGAAGCTGCTATCAAT
 GAACTAAAGCAGTATGGCATTAGTGATTACTATGTGACCTTAATCAACAAAGCCAAATAA
CTCGAGCGGCCGCAT

5 **SEQ ID NO: 34. Proteína de fusión CPCE.** Los aminoácidos subrayados indican la secuencia que se origina a partir del vector. El * indica un sitio de escisión de proteasa tijera. Nótese que los aminoácidos en negrita se originan a partir del trabajo de construcción de la proteína de fusión y que estos aminoácidos podían estar cambiados o incluso ausentes si se usaba otra estrategia de fusión.

LEVLFQ*GPLGSTNLSDNITSLTVASSSLRDGERTTVKVAFFDDKKQKIKAGDTIEVTWPTS
 GNVYIQGFNKTIPLNIRGVDVGTLEVTLDKAVFTFNQNIETMHDVSGWGEFDITVRNVTQ
 TTAETSGTTTTVKVGNRTATITVTKPEAGTGTSSFYKYTGDMQPNDTERVRWFLINNNKE
 WVANTVTVEDDIQGGQTLDMSSFDITVSGYRNERFVGENALTEFHTTFPNSVITATDNHI
 SVRLDQYDASQNTVNIAYKTKITDFDQKEFANNSKIWYQILYKDQVSGQESNHQVANINA
 NGGVDGSRYSFTVK**ELD**TASYTITVEGATAGHTYEAYQIFKGDLFDSLNSNITWGGGVT
 PFEFDGSKDAAKIAEGLKEANAAFAKEAGKHLTATIAGTGTHAITVNEAGYYLIKDKND
 SQTGKHDAYTSFVLKVVKNTSFKPKSAIPTVLKKVKDRNDKTGLETGWQDSADYDKNDKV
 PFQLTATLPSNYDAFQEYYLEFVDTLKGLSYNKDAKVYVVNGDTRQDITNSFTVSEDGS
 SFKINNLKAVQGVITATSKIVVEYTATLNDQAAIGKKGNPNEVALKYSNDPNALGKGEE
 SPKGETPKDKVIVFTYKT**SR**LSGPPGYPLTRDFSRNFLEENTAKYLDQLREHLQHRFSEL
 ESLTRKLEKEGGTRGP**LQD**QPAALKYPEPRDYFLHTREGDVIYDEDIKRYFEDLEAYLTA
 RLGIDKKVEEAAQKP**EL**LDAATVLEPTTAFIREAVREINQLSDDYADNQLQAVLANAG
 VEALAADTVDQAKAALDKAKAAVAGVQLDEARREAYRTINALSDQHKSQKVQLALVAAA
 AKVADAASVDQVNAAINDAHTAIADITGAALLEAKEAAINELKQYGISDYVYVTLINKAK

10 **Ejemplo 9. Purificación de proteínas recombinantes**

El vector pGEX-6P-1 usado es una parte de un sistema de expresión y purificación en *E. coli* llamado sistema de afinidad de GST-glutatión (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). En resumen, siguiendo las instrucciones del fabricante los clones que codifican proteínas recombinantes se cultivaron a 37 °C en medio caldo Luria Bertani suplementado con ampicilina (conc. final 50 µg/ml). A una densidad óptica (DO₆₀₀) ~ 0,6, el medio de cultivo se suplementó con IPTG (conc. final 0,2 mM) y la temperatura de cultivo se cambió a 15 °C. Después de la incubación durante una noche las células de *E. coli* se recogieron y se resuspendieron en una solución salina tamponada con fosfato PBS [NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM (pH 7,4)] suplementada con TWEEN 20, conc. final 0,1 % (v/v) (PBST) y se añadió lisozima (conc. final 50 µg/ml) tras lo cual las células se lisaron mediante congelación y descongelación. Después del centrifugado, el sobrenadante se filtró de forma estéril y se purificó por lotes con perlas de Glutatión-Sepharose™. Después de un lavado exhaustivo usando PBST, la proteína de fusión se trató con proteasa tijera para liberar las proteínas recombinantes. Las muestras eluidas que contienen los antígenos se dializaron contra PBS y se concentraron. Finalmente, las cantidades de antígenos obtenidos se determinaron usando un espectrofotómetro y la calidad se analizó mediante SDS-PAGE (realizada en condiciones reductoras) tras lo cual los geles se tiñeron con azul brillante de coomassie. Las proteínas se almacenaron finalmente a -20 °C. Debe señalarse que cada proteína producida en este sistema (SEQ ID NOS: 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34) contiene cinco aminoácidos N-terminales adicionales, Gly-Pro-Leu-Gly-Ser, que se derivan del vector. El extremo C-terminal de cada proteína es tal como se indica, dado que se añadió un codón de terminación a la secuencia del cebador.

30

Otro sistema de expresión y purificación en *E. coli* usado fue el sistema IMPACT de New England Biolabs. El uso de este sistema para producir proteínas recombinantes de *S. equi* se ha descrito previamente (por ejemplo Ref. 14). Debe señalarse que cada proteína producida en este sistema (SEQ ID NO: 38 y 42) contiene cinco aminoácidos adicionales, una Met en la parte N-terminal y cuatro Leu-Glu-Pro-Gly en la C-terminal, que se derivan del vector.

5 Ejemplo 10. Formulación de vacunas Strangvacc para inmunizaciones de caballos

Las proteínas recombinantes descritas en los ejemplos se después de purificación (ejemplo 9) en las siguientes combinaciones.

10 Strangvacc 1.

Esta combinación de siete proteínas recombinantes (llamada previamente Septavacc) consiste en proteínas (fragmentos de) EAG, CNE, ScIC, IdeE, IdeE2, SEQ0256 (Eq5), SEQ0402 (Eq8) y se ha descrito previamente en el documento WO 2009/075646 (A1) y Ref. 13 y 14.

15 Strangvacc 2.

Esta combinación consiste en cuatro proteínas recombinantes IdeE2, IdeE, Eq85 y CCE de las cuales dos son proteínas de fusión (Eq85 y CCE).

20 Strangvacc 3/4.

Esta combinación consiste en tres proteínas recombinantes IdeE, Eq85 y CCE de las cuales dos son proteínas de fusión (Eq85 y CCE).

25 Strangvacc 5.

Esta combinación consiste en tres proteínas recombinantes CNEEAG, IE5 y EndoSe de las cuales dos son proteínas de fusión (CNEEAG e IE5).

30 Strangvacc 7.

Esta combinación consiste en dos proteínas de fusión recombinantes CPCE e IE5.

35 Strangvacc 8.

Esta combinación consiste en tres proteínas recombinantes CPCE, IE5 y EndoSe de las cuales dos son proteínas de fusión (CPCE e IE5).

40 Cada una de las vacunas Strangvacc (1-8) se formuló, en resumen, de la siguiente manera:

45 Para inmunización subcutánea, cada dosis contenía 75 µg de cada proteína mezclada con 375 µg/dosis del adyuvante Matrix C. (Excepto para Strangvacc 1 donde cada dosis contenía 50 µg de cada proteína). El volumen de la dosis fue de 2 ml que se inyectaron por vía subcutánea 1 ml + 1 ml cerca de los ganglios linfáticos retrofaríngeos en cada lado.

50 Para inmunización intranasal, cada dosis contenía 225 µg de cada proteína mezclados con 500 µg/dosis del adyuvante Matrix Q. (Excepto para Strangvacc 1 donde cada dosis contenía 150 µg de cada proteína). El volumen de la dosis fue de 4 ml que se inyectaron por vía intranasal 2 ml+2 ml en cada ollar.

Para inmunización intramuscular cada dosis contenía 300 µg de cada proteína mezclados con 375 µg/dosis del adyuvante Matrix C. Volumen de la dosis 2 ml que se inyectaron en una ubicación intramuscular.

55 Para ajustar los volúmenes en la preparación Strangvacc respectiva, se usó PBS. En las muestras de placebo, las proteínas recombinantes se omitieron. Matrix C y Q se obtuvieron de Isconova AB, Uppsala, Suecia.

60 Los caballos se vacunaron tres veces. El tiempo entre la primera y la segunda vacunación fue de siete semanas. El tiempo entre la segunda y la tercera vacunación fue de dos semanas y los caballos fueron provocados dos semanas después de la última vacunación.

Ejemplo 11. Estudios de inmunización y provocación en caballos

65 Estudio I. Este estudio de vacunación y provocación se realizó en el Animal Health Trust, Lanwades Park, Kentford, Newmarket, Suffolk, CB8 7UU, Reino Unido patrocinado por Intervacc AB, Suecia (identificación del estudio

B009/001). El estudio II (identificación del estudio B009/002) también se realizó en la misma ubicación. El objetivo de estos estudios era determinar el nivel de protección otorgada por la vacunación con variantes de la nueva vacuna de subunidad multicomponente de Intervacc, después de provocación intranasal con la cepa de *S. equi* de tipo silvestre 4047 en ponis Welsh Mountain.

5 En resumen, todos los procedimientos para inmunización, infección experimental y evaluación clínica de los caballos fueron tal como se describe en PLoS Path, Guss et al (2009), Ref. 14, y WO 2009/075646 A1. Sin embargo, el estudio II se amplió para incluir también un grupo independiente de caballos (grupo 6) que fueron vacunados solamente por vía intramuscular (tres vacunaciones). En resumen, en los estudios de vacunación y provocación, se monitorizaron varios parámetros, tales como síntomas clínicos, temperatura rectal, observaciones en el sitio de inyección, e hinchazón de los ganglios linfáticos etc. El número de bacterias de *S. equi* y *S. zooepidemicus* también se monitorizaron. Además, también se extrajeron muestras de sangre y se usaron para determinar, por ejemplo, niveles de neutrófilos y fibrinógeno y la respuesta a anticuerpos contra antígenos presentes en la vacuna respectiva. Después de la finalización de los estudios de vacunación/provocación, los caballos fueron sacrificados y se realizaron exámenes post mortem (PM).

15 Tabla 3: Grupos de vacunación. IN significa inmunización intranasal. SC significa inmunización subcutánea. Matrix es un adyuvante de Isconova AB, Uppsala, Suecia.

Estudio I				
Grupo	Vacuna	ID del chip del poni	Vía	PM
1	Strangvacc 2 + Matrix	2691, 2695, 2703, 2711,2717,2811	IN + SC	17
2	Strangvacc 3/4 + Matrix	2849,2900,2901, 2930,3028,3060	IN + SC	21
3	Placebo + adyuvantes	3156, 3250, 3693, 3736,3844,9624	IN + SC	48
Estudio II				
Grupo	Vacuna	ID del chip del poni	Vía	PM
1	Strangvacc 3/4 + Matrix	0278,0594,0481 0504,1529	IN + SC	2
2	Strangvacc 5 + Matrix	1567,2226,2259 2277,2417,2749	IN + SC	21
3	Strangvacc 7 + Matrix	2227,2633,2775 3305,3329,3611	IN + SC	18
4	Strangvacc 8 + Matrix	2720,3062,3680 3773,3942,3954	IN + SC	26
5	Placebo + Matrix	3839,9893,4069 9170,9408	IN + SC	38
6	Strangvacc 8 + Matrix	3596,3730,3762 2799,2991,9240 9807	Intramuscular	28
PM= valor medio a partir de la puntuación de patología, según se tomó en el examen post mortem.				

Ejemplo 12.

20 Se vacunaron ponis Welsh Mountain con Strangvacc 2 (n=6), Strangvacc 3/4 (n=6) y placebo (n=6) en el estudio I. En el estudio II, los ponis se vacunaron con Strangvacc 3/4 (n=5), Strangvacc 5 (n=6), Strangvacc 7 (n=6), Strangvacc 8 (n= 6) y placebo (n=5). Los ponis a los que se administró placebo sirven como controles y se les administró adyuvante solamente. Las inmunizaciones se realizaron en tres ocasiones por vía intranasal y por vía subcutánea en ambos lados. Todos los ponis se infectaron de forma experimental con *S. equi* para causar adenitis equina. Los ponis se sometieron a exámenes clínicos a diario y se monitorizaron las temperaturas rectales. La pirexia es un signo típico de la adenitis equina y se correlaciona muy bien con los parámetros inflamatorios, tales como nivel de fibrinógeno y recuentos de neutrófilos elevados en la sangre. Todos los procedimientos para inmunización, infección experimental y evaluación clínica de los caballos fueron tal como se describe en PLoS Path, Guss et al (2009).

35 La figura 1 (figuras 1A-C) incluye 8 paneles, que muestran, cada uno, la temperatura de ponis individuales para cada grupo vacunado, tal como se indica en la parte superior de cada panel. Queda claro a partir de los gráficos que diferentes formulaciones dan como resultado diferentes niveles de protección. Como ejemplo, la vacunación con Strangvacc 3/4 da como resultado solamente uno de once ponis (estudios I y II combinados) con pirexia patológica, definidos como temperatura que supera los 39 °C. Strangvacc 8, por otro lado, aunque protectora, da como resultado 3-4 de seis ponis con pirexia.

Ejemplo 13.

Ponis vacunados tal como se describe para el ejemplo 12 anteriormente se sometieron a análisis post mortem en el criterio de valoración de los experimentos. El criterio de valoración se define como pirexia durante 3 días, signos clínicos obvios de infección con sufrimiento o al final del estudio (día 21 en el estudio I o día 25 en el estudio II). Se usó un sistema de puntuación para diversas observaciones post mortem, tal como se describe en PLoS Path, Guss et al (2009), Ref 14. La puntuación añadida se muestra en la figura 2 donde cada punto representa un poni individual. De los once ponis vacunados con Strangvacc 3/4 solamente tres presentaban una puntuación alta patológica. La puntuación más elevada (46) es el mismo individuo que aquel con pirexia. Strangvacc 8 dio como resultado dos ponis completamente protegidos y uno intermedio, basándose en la puntuación post mortem. Usando un análisis estadístico de Mann Whitney de los grupos en comparación con los grupos de placebo combinados (n = 11), se obtuvieron los siguientes valores p -: Strangvacc 2, 0,0019; Strangvacc 3/4, 0,00027; Strangvacc 5, 0,0048; Strangvacc 7, 0,00064; Strangvacc 8, 0,078. Se descubrió una buena correlación entre parámetros tales como tiempo hasta pirexia y puntuación post mortem; se descubrió un tiempo hasta pirexia corto en ponis con alta puntuación post mortem. Tal como es obvio a partir del gráfico, diferentes combinaciones de proteínas de fusión en las vacunas dan como resultado un nivel de protección diferente.

Ejemplo 14.

Las respuestas de anticuerpos en ponis vacunados se determinaron tal como se describe en PLoS Path, Guss et al (2009), Ref. 14. En resumen, se usó un ensayo ELISA convencional donde muestras de suero se diluyeron en series de dos veces. Los valores logarítmicos de la dilución requeridos para dar un valor de absorbancia de 1,0 se determinaron para cada muestra. Se analizaron sueros de ponis inmunizados en un estudio previo donde se usó una vacuna, Septavacc (también: llamada Strangvacc 1). Strangvacc 1 contiene siete proteínas recombinantes como proteínas únicas. También se analizaron sueros de ponis vacunados con diversas proteínas de fusión.

Todos los ponis vacunados con cualquiera de las vacunas Strangvacc respondieron inmunológicamente. Éste es el caso tanto para Strangvacc 1, donde los antígenos son antígenos únicos, como para las otras vacunas Strangvacc con proteínas de fusión.

En ningún caso dio una proteína de fusión como resultado que una proteína incluida se volviera no inmunógena, debido a plegamiento o exposición al sistema inmunitario desfavorables.

La figura 3 muestra en su lugar que la inmunogenicidad es, en algunos casos, potenciada significativamente usando proteínas de fusión. El panel superior en la figura 3 muestra que los anticuerpos en ponis vacunados con Strangvacc 2 y Strangvacc 3/4 tienen anticuerpos anti CNE significativamente (p = 0,04) mejores que los ponis vacunados con Strangvacc 1. CNE está en Strangvacc 2 y 3/4 incluida en la misma fusión que EAG. En Strangvacc 1, CNE está incluida como una proteína única. Análogamente, el panel inferior en la figura 3 muestra que los anticuerpos contra Eq5 (= SEQ0256) son significativamente más elevados (p = 0,0008) en ponis vacunados con proteínas de fusión que con Eq5 como proteína única.

Ejemplo 15. Vacunación intramuscular usando Strangvacc 8.

La vacunación intramuscular usando Strangvacc 8 (grupo 6 en el estudio II) dio como resultado un nivel de protección similar al grupo 4 en el estudio II.

Ejemplo 16. Construcción de clones que expresan fragmentos de proteínas Eq54 y Eq27 que se usarán como antígenos recombinantes en la vacunación de ratones contra infección por *S. equi*

Un fragmento génico del gen *eq54* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores Eq54F y Eq54R. Después de amplificación y purificación el fragmento se digirió con NcoI y XhoI y se ligó en el vector escindido con NcoI y XhoI, pTYB4 obtenido de New England Biolabs Inc., Estados Unidos (NEB).

Tabla 4. Cebadores usados para clonar el fragmento del gen *eq54*

SEQ ID 35. Eq54F 5'-gc**atccatgg**atcacgcaagctatacca-3'
 SEQ ID 36. Eq54R 3'-caattattttcc**agataggagctc**agct-5'
SEQ ID NO: 37. La secuencia de nucleótidos del gen *eq54* insertada en el vector pTYB4. Los sitios de NcoI y XhoI se indican en negrita y las secuencias del vector están subrayadas.

CCATGGAATACAGCAAGCTATAACCATCACTGTTGAGGGAGCTACAGCAGGTCACACC
TATGAGGCTTATCAGATTTTCAAGGGTGACTTGTGGACAGTACCCTATCAAACATCACA
TGGGGAGGTGGTGTACACCTTTTGAATTTGATGGTTCAAAGACGCTGCTAAGATTGCA
GAGGGATTGAAGGAAGCAAATGCAGCTGCCTTTGCCAAGGAAGCAGGTAAGCACTTGACA
GCAACCATTGCAGGAACAGGAACACATGCAATCACCGTTAACGAGGCTGGCTACTACCTC
ATCAAGGACAAAATGATTCTCAAACAGGCAAGCATGACGCCTACACCTCATTGTCTTG
AAGGTTGTTAAAAACACCAGCTTCAAACCAAATCTGCTATCCCAACAGTCCTTAAAAAG
GTCAAGGACCGTAATGACAAGACAGGTCTTGAGACAGGCTGGCAAGATTCAGCTGACTAT
GACAAAAATGACAAGGTGCCATTCCAGCTAACCGCAACCCTACCGTCAAATTACGATGCC
TTTCAAGAATACTACCTTGAATTTGTAGATACCTTATCAAAGGGCTAAGCTACAACAAA
GACGCCAAGGTCTATGTGGTTAATGGAGATACTCGTCAAGATATTACTAATTCATTTACA
GTTAGTGAAGATGGTTCATCTTTTAAAATCAATAACCTAAAGGCTGTTGAGGGAGTAACA
ATAACAGCTACCAGTAAGATCGTTGTGCAATACACTGCTACCCTCAATGACCAAGCGGCC
ATCGGCCAAAAAAGGAAATCCAAACGAAGTTGCTTTGAAATACTCAAACGATCCAAACGCT
CTTGAAAAAGGAGAGGAGTCTCCAAAAGGGGAGACACCAAAGACAAGGTTATCGTTTTTC
ACCTATAAACTATCATCAATAAGGTTGATCAAGATCAAAGCCCTAAAAGGTGCAGGC
TTTACCCTTTATAAGCTGGTCAAAGGTGATAATGGCGAGGAAAAATATCAAATAGTCCAA
GAAATTAAAGCAGGGGATACAACACTAGCTTTGAGTTTGTGGACTTGACGCTGGTGATTAC
AAGCTCAGCGAAACAACAACACCTGGCGGTTACAACACTATTGCAGATGTCATGTTGAGC
ATTGTAGCGCAGCATGAAACCGAGTCAGACGATCCTCAGTTGACTAGCCTAACCGTTGAC
AAAGCAACTGGCTTCACTGCTGATACAGAAGCTGGTACCGTATCCGCAACTATTGTTAAT
AAAAGGTCATC**CTCGAG**CCCCGGGTGC

- 5 **SEQ ID NO: 38.** Proteína Eq54 expresada usando el sistema IMPACT™ (NEB). Nótese que el aminoácido N-terminal Met y los cuatro aminoácidos C-terminales amino Leu-Glu-Pro-Gly se originan del vector.

MDTASYTITVEGATAGHTYEAYQIFKGLFDSTLSNITWGGVTPFEFDGSKDAAKIAEG
LKEANAAFAKEAGKHLTATIAGTGTHAITVNEAGYYLIKDKNDSQTGKHDAYTSFVLKV
VKNTSFKPKSAIPTVLKVKDRNDKTGLETGWQDSADYDKNDKVPFQLTATLPSNYDAFQ
EYYLEFVDTLKGLSYNKDAKVYVVNGDTRQDITNSFTVSEDGSSFKINNLKAVQGVIT
ATSKIIVVEYTATLNDQAAIGKKNPNEVALKYSNDPNALGKGEESEPKGETPKDKVIVFTY
KTIINKVDQDQKALKGAGFTLYKLVKGDNGEEKYQIVQEIKAGDTTSFEFVGLDAGDYKL
SETTTPGGYNTIADVMSIVAQHETESDDPQLTSLTVDKATGFTADTEAGTVSATIVNKR
S**ILEPG**

- 10 El sistema IMPACT también se usó para clonar y expresar un fragmento de la proteína Eq27. Un fragmento génico del gen eq27 se amplificó por PCR usando los pares de cebadores Eqp271 y Eqp272. Después de amplificación y purificación, el fragmento se digirió con NcoI y XhoI y se ligó en el vector escindido con NcoI y XhoI, pTYB4 obtenido

de New England Biolabs Inc., Estados Unidos (NEB)

Tabla 5. Cebadores (5'-3') usados para clonar el fragmento del gen *eq27*.

- 5 SEQ ID NO: 39, Eqp271: gcagccatggagagtctgacgagtggtga
 SEQ ID NO: 40, Eqp272: TCACCTCGAGTCCTAGCTCACCGTCATAAGC
 SEQ ID NO: 41. La secuencia de nucleótidos del gen *eq27* insertada en el vector pTYB4. Los sitios de NcoI y XhoI se indican en negrita y las secuencias del vector están subrayadas.

CCATGGAGAGTCTGACGAGTGTTGAGCCTGCTGATGGTGCGGTCATGGTCAAGTCAGAGG
 CTGCTGACCAAGGCTCAAATGAGCTACCAGAAGCTACTGACATTAGTGATATTGCTGGTA
 TTTCTGATGTGACTAAGGTGTCAGCTGCTGTCAATGCTGATACTGTCAAGGAAGTTCAGC
 CAGTAGCTGTACCTCTTGTAGAGGATCAGGCGCATGAGGAACTACAGACCAGTCTCAGC
 CTTTCATCATCGATAGTGTCTGTTACGACAGACAGCTCTCTAGAGACACCAGAAGCTACAA
 GCTCAGAGGAGCCGATAGCGGAGCAGACCTTGCGGCTGCATTTCAAGACCCTGCCAGCTC
 AAGACCTATCCTCGCTTGGTCTTTGGGTGTGGGACGATGTTGAGACACCATCTGATCAGC
 TGGGAGGCTGGCCGACTGGGGCTACCAATTTTAGTCTAGCGAAGACAGATGACTATGGCT
 ATTACATGGACGTTAAGCTTTTCAGCCAATCAAGCCAATAAGGTTAGCTTTTTGATCAATA
 AACTAAGGGAGACAATCTGACGGGCGATCGAACCATAGACCTTCTCAGCCCTAAGATGA
 ATGAGGTCTGGATTGATGGCCAGGAGCTGTCTTACTATCGGCCGCTGGCTCAGGGCTATA
 TCCGTATCAATTATTATCGCAGTGATGGCCATTATGACAACAAATCGCTCTGGCTTTGGG
 GAAGTGCTGATGCGTCAATGACTAGTCAGCAGGGCGCTTGGCCAGATGGTATTGATTTTA
 AGCAGGTCGGTCGATATGGTGCTTATATAGATGTCAAGCTAGCTGATACCAATGAGCTAG
 GCTTTCTCTTGCTAGATGAGCGTCAGACAGGTGACGCTGTTAAAATTCAGCCCAATGATT
 ATATTTTTAAAGATTTAAAGAATCACACCCAAATTTTCTTGAAAGACGAGGATCCAACCA
 TTTATACGAACCCTTATTTTGTTAATACAGTTAGATTAATCGGTGCTCAGCAGGTGAGCC
 CAAGCAGTATTGAGGCGAGCTTTACGACTCTAGCAGATGTGGATAAGGAAAGCCTTTTAA
 AAGAATTAATAATCAGCACTGACAGTAAGGAAGCAGTTGCTATTACTGATATCACCTTAG
 ATGAAAAGACTCATAAGGCTGTCATCACAGGTGATTTTAGTCAAGCAGTGGCCACTTATA
 CGGTGACCTTTTCATCATGAGAGCTTCCAGGCTAGGCCAAATTGGCAATACAAGGATAGCC
 TGTATGCTTATGACGGTGAGCTAGGA**CTCGAG**CCCGGGTGC

- 10 SEQ ID NO: 42. Fragmento de proteína Eq27 expresado usando el sistema IMPACT™ (NEB). Nótese que el aminoácido N-terminal Met y los cuatro aminoácidos C-terminales Leu-Glu-Pro-Gly se originan del vector.

MESLTSVEPADGAVMVKSEAADQGSNELPEATDISDIAGISDVTKVSAAVNADTVKEVQP
 VAVPLVEDQAHEETTDQSQPSSSIVSVTTDSSLETPEATSSEEP IAEQTLRLHFKTLPAQ
 DLSSLGLVWVDDVETPSDQLGGWPTGATNFS LAKTDDYGYMDVKLSANQANKVSFLINN
 TKGDNLTGDRTIDLLSPKMNEVWIDGQELSYYRPLAQQYIRINYRSDGHYDNKSLWLWG
 SADASMTSQQGAWPDGIDFKQVGRYGAYIDVKLADTNELGFLLLDERQTGDAVKIQPNDY
 IFKDLKNHTQIFLKDEDPTIYTNPYFVNTVRLIGAQQVSPSSIEASFTTLADVDKESLLK
 ELKISTDSKEAVAITDITLDEKTHKAVITGDFSQAVATYTVTFHHESFQARPNWQYKDSL
 YAYDGELGLEPG

Vacunación intranasal con Eq 54 y Eq27 seguida por provocación con *Streptococcus equi*

5 Ejemplo 17. Inmunización de ratones con Eq54 y Eq27

Ratones (NMRI) que pesaban aproximadamente 23-25 g se guardaron en jaulas de cinco animales en cada una. Los ratones se inmunizaron por vía intranasal con 12 microgramos de cada antígeno y 10 microgramos de Abisco 300 (Isconova AB, Suecia). Diez animales se inmunizaron con Eq54, 10 animales se inmunizaron con Eq27 y a 10 se les administró adyuvante Abisco 300 solamente para servir como control negativo. Las inmunizaciones se administraron los días 0, 31 y 45.

Ejemplo 18. Infección experimental con *Streptococcus equi*

15 Se administró infección experimental el día 52 (7 días después de la última vez de inmunización). Se usó la cepa de *S. equi* 1866 de un caso clínico de adenitis equina. La cepa se hizo pasar en primer lugar a través de un animal inoculando aproximadamente 10^6 UFC en las narinas de un ratón anestesiado. Las bacterias se recuperaron después de 7 días del hocico del ratón y se cultivaron en placas BG (placas de agar que contenían sangre de oveja al 5 % violeta de genciana al 0,01 %) a 37 °C en CO₂ al 5 %. Una única colonia se cultivó en placas BG durante una noche a 37 °C y se resuspendió en caldo Todd Hewitt (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) (THB) con extracto de levadura al 1 % (THY). Las bacterias se mantuvieron a -80 °C en viales y se usó un nuevo vial para cada experimento. Para infectar ratones, se cultivaron bacterias en placas BG a 37 °C en CO₂ al 5 % durante una noche, seguido por inoculación en THB suplementado con extracto de levadura (THY) al 1 % y se cultivaron sin agitación durante una noche. El cultivo se diluyó a continuación 10 veces en THY y suero de caballo al 10 % (Sigma) y se cultivaron durante 4 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %. El cultivo se centrifugó y se resuspendió en THB. Una dosis que contenía 1×10^6 UFC en 10 μ l se usó para todas las infecciones por *S. equi* de ratones. Se realizó un seguimiento de los animales diariamente. El crecimiento nasal bacteriano se puntuó en una escala de cuatro grados de 0 a +++ presionando suavemente el hocico del animal sobre una placa BG de manera reproducible. La muestra nasal se extendió a continuación sobre toda la superficie de la placa. Un + significa 5-100 colonias; dos + significa más de 100 y tres + significa crecimiento confluyente. El peso se determinó cada día y se calculó el porcentaje de pérdida de peso.

Ejemplo 19. Resultados experimentales de vacunación con Eq54 o Eq27.

35 Tres grupos de ratones (n = 3x10) se inmunizaron con 1) Eq54 2) Eq27 y 3) grupo no inmunizado donde el antígeno se sustituyó por PBS, pero seguía conteniendo el adyuvante.

40 Un signo de infección típico en ratones infectados con *S. equi* subsp. *equi* es la pérdida de peso. El porcentaje de pérdida de peso a lo largo del tiempo se determinó de este modo. La figura 4B muestra que los animales vacunados con Eq54 o Eq27 estaban protegidos de la infección, reflejaban una pérdida de peso más moderada en comparación con animales de control. Los animales que perdieron más del 20 % de su peso fueron sacrificados. Puede verse, en la figura 4B, que los animales no vacunados perdieron más peso que los animales vacunados. El día 2 a 4, $p < 0,05$ para Eq54 y para Eq27 en comparación con los controles.

45 Otro signo de infección persistentes de ratones por *S. equi* subsp. *equi* es la colonización de bacterias en las vías respiratorias superiores. Por lo tanto, el crecimiento nasal de *S. equi* se determinó diariamente en una escala de cuatro grados. La figura 4C muestra que, después de 2 a 3 días, los animales de control no vacunados fueron colonizados fuertemente con bacterias. Los ratones vacunados con Eq54 o Eq27 fueron significativamente ($p < 0,05$) menos colonizados en comparación con el grupo de control los días 2 y 3.

50

Ejemplo 20. Determinación de niveles de anticuerpo en ratones inmunizados

Los ratones se inmunizaron tal como se ha descrito anteriormente. Se recogieron muestras de suero 5 días después de la última vacunación. Se usó ensayo inmunoadsorbente ligado a enzimas estándar (ELISA) para determinar los niveles de IgG dirigida específicamente contra Eq54 y Eq27. En resumen, placas de microvaloración se revistieron con 100 µl durante una noche a temperatura ambiente con proteína a 9 µg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se añadió albúmina de suero bovino, 100 µl al 2 %, (1 hora a 37 °C). Las placas se lavaron con PBS con Tween al 0,05 % (PBST). Se añadieron muestras de suero a diluciones sucesivas, comenzando a una dilución de 40 veces (1 hora a 37 °C) seguida por lavado. La unión específica de IgG a los antígenos se monitorizó añadiendo anticuerpos IgG anti-ratón generados en conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (Sigma Chemical Co, Mo, Estados Unidos); 100 µl por pocillo a una dilución de 1000 veces. Después de lavar en PBST, la unión del conjugado se midió añadiendo sustrato OPD de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Dako, Glostrup, Dinamarca). La coloración se determinó a 492 nm en un espectrofotómetro de ELISA estándar. Los valores de absorbancia obtenidos se representaron gráficamente en función de la dilución del suero. Para cada muestra, se determinaron los valores logarítmicos en base 10 de la dilución requeridos para rebajar el valor de absorbancia a 1,5. Es decir, si una muestra requiere una dilución de 2000 veces para dar una absorbancia de 1,5, a esa muestra se le asigna un valor de 3,30. La figura 4A muestra los valores cuantitativos de anticuerpo contra Eq54 y Eq27 en ratones inmunizados con estos antígenos.

20 Referencias

- 1.) Albert, H., Collin, M., Dudziak, D., Ravetch, J. y Nimmerjahn, F. (2008). PNAS 105: 15005-15009.
- 2.) Allhorn M, y Collin M. Ann N Y Acad Sci. 2009 Sep; 1173:664-9.
- 3.) Allhorn, M, Olin, A.I. Nimmerjahn, F. y Collin, M. PLoS ONE (www.plosone.org) enero de 2008. Número 1. e1413. Acceso libre.
- 4.) Allhorn, M., Olsén, A y Collin, M. BMC Microbiology 2008 8: 3. (<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/3>) Acceso libre.
- 5.) Barnham, M., A. Ljunggren, y M. McIntyre. 1987. Epidem. Inf. 98: 183-190.
- 6.) Bisno AL, Brito MO, Collins CM. (2003) Lancet Infect Dis. Abr; 3(4):191-200. Revisión.
- 7.) Chhatwal GS, McMillan DJ. (2005) Trends Mol Med. Abr; 11(4):152-5. Revisión.
- 8.) Collin, M. y Olsén, A. (2001). EMBO J 20: 3046-3055.
- 9.) Collin M, Olsén A. (2003) Infect Immun. Jun; 71(6): 2983-92. Revisión.
- 10.) Fernandez, E. et al. 2004. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2291-2296.
- 11.) Flock, M., Jacobsson, K., Frykberg, L., Hirst, T., R., Franklin, A., Guss, B. y Flock, J.-I. (2004) Infect Immun 72: 3228-3236.
- 12.) Flock M, Karlström Å, Lannergård J, Guss B, Flock J.-I. (2006) Vaccine. Mayo 8; 24(19): 4144-51.
- 13.) Guss, B., Flock, M., Frykberg, L., Waller, A., Robinson, C., Smith, K. y Flock, J.-I.: Disponible de Nature Precedings <<http://hdl.handle.net/10101/npre.2009.2985.1>> (2009) Publicado el 26 de marzo de 2009.
- 14.) Guss B, Flock M, Frykberg L, Waller AS, Robinson C, et al. (2009) PLoS Pathog 5(9): e100058 doi:10.1371/journal.ppat.1000. 18 de septiembre de 2009.
- 15.) Holden MT, Heather Z, Paillot R, Steward KF, Webb K, et al. (2009) PLoS Pathog 5: e1000346.
- 16.) Hulting, G. et al 2009 FEMS Microbiol Lett. 298: 44-50.
- 17.) Jacobs, A.A, Goovaerts, D., Nuijten, P.J., Theelen, R.P., Hartford, O.M., et al. (2000) Vet Rec 147: 563-567.
- 18.) Jacobsson, K., Jonsson, H., Lindmark, H., Guss, B., Lindberg, M., y Frykberg, L. (1997) Microbiol Res. 152: 1-8.
- 19.) Janulczyk, R. y Rasmussen, M. (2001) Infect Immun 4019-4026.
- 20.) Jonsson, H., Lindmark, H., y Guss, B. (1995) Infect Immun 63: 2968-2975.
- 21.) Karlström, Å. et al (2004) Vet Microbiol. Dic 9; 104(3-4): 179-88.
- 22.) Karlström, Å. et al (2006) Vet Microbiol. Abr 16; 114(1-2): 72-81.
- 23.) Kemp-Symonds J, Kemble T, Waller A (2007) Equine Vet J 39: 284-286.
- 24.) Lannergård, J. (2006) Potentially virulence-related extracellular proteins of Streptococcus equi. (Tesis doctoral) Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Agraria 2006: 80. ISBN 91-576-7129-X.
- 25.) Lannergård, J., Frykberg, L. y Guss B. (2003) FEMS Microbiol. Lett. 222: 69-74.
- 26.) Lannergård, J. y Guss, B. (2006) FEMS Microbiol Lett 262: 230-235.
- 27.) Lindmark, H. (1999) Characterization of adhesive extracellular proteins from Streptococcus equi. (Tesis doctoral) Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Agraria 139. ISBN 91-576-5488-3.
- 28.) Lindmark, H., y Guss, B. (1999) Infect. Immun. 67: 2383-2388.
- 29.) Lindmark, H., Jacobsson, K., Frykberg, L., y Guss, B. (1996) Infect Immun 64: 3993-3999.
- 30.) Lindmark, H., Jonsson, P., Olsson-Engvall, E., y Guss, B. (1999) Res Vet Sci. 66: 93-99.
- 31.) Lindmark, H., Nilsson, M., y Guss, B. (2001) Infect immun 69: 3159-3163.
- 32.) Morein, B. y Lövgren Bengtsson. K. (1998) Immunology and Cellbiology 76: 295-299.
- 33.) Nakata, M. et al (2009) Infect Immun 77: 32-44.
- 34.) Nandakumar, K.S., Collin, M. Olsén, M. et al. 2007. Eur. J. Immunol. 37: 2973-2982.
- 35.) Newton R, Waller A, King, A (2005) Investigation of suspected adverse reactions following strangles vaccination in horses. Vet Rec 156: 291-292.
- 36.) Rasmussen, M. et al (1999) J Biol Chem 274: 15336-15344.

- 37.) Schneewind, O., Fowler, A. y Faull, K.F. (1995) Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. *Science* 268: 103-106.
 38.) Sutcliffe IC, Harrington DJ. (2002) *Microbiology*. Jul; 148(Pt 7): 2065-77.
 39.) Sweeney et al (2005) *J Vet Int Med* 19: 123-134.
 5 40.) Timoney JF. (2004) *Vet Res*. 35: 397-409.
 41.) Timoney JF, Kumar P (2008) Early pathogenesis of equine *Streptococcus equi* infection (strangles). *Equine Vet J* 40: 637-642.
 42.) Timoney JF, Qin A, Muthupalani S, Artiushin S (2007) Vaccine potential of novel surface exposed and secreted proteins of *Streptococcus equi*. *Vaccine* 25: 5583-5590.
 10 43.) Turner CE, et al. (2009) *Vaccine*. Ago 6; 27(36): 4923-9. Publicación en línea 27 de junio de 2009.
 44.) Walker, J.A. y Timoney, J.F. (2002) *Vet Microbiol* 89: 311-321.
 45.) Waller, A., Flock, M., Smith, K., Robinson, C., Mitchell, Z., Karlström, A., Lannergård, J., Bergman, R., Guss, B. and Flock, J.-I. (2007) *Vaccine* 25: 3629-3635.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Intervacc AB
- <120> Vacuna contra infecciones estreptocócicas basada en proteínas recombinantes
- 20 <130> P9217PC00
- <150> US 61/348.376
- <151> 26-05-2010
- 25 <160> 42
- <170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>
 <223> Cebador de PCR
- <400> 1
 ggttgatcc actaatctta gtgacaacat cac 33
- 40 <210> 2
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> Cebador de PCR
- <400> 2
 50 tccagagctc cttgacagta aagctggtat ag 32
- <210> 3
 <211> 28
 <212> ADN
- 55 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Cebador de PCR
- 60 <400> 3
 agtggagctc ttagacgcag caacagtg 28
- <210> 4
 <211> 35
 <212> ADN
- 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 4
 5 caccctcgag ttatttggt ttgtgatta aggtc 35

 <210> 5
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 5
 15 cgtagagctc tcggaacca atccatc 29

 <210> 6
 <211> 29
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 6
 25 gaggtctaga aggacctgt ttgccatt 29

 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 7
 35 agcatctaga ttatctggtc cgccagga 28

 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 8
 45 gaggtgcag tggacctgg gtaccgcctt 30

 <210> 9
 <211> 29
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 9
 55 agtactgcag gaccagccag cagcactaa 29

 <210> 10
 <211> 31
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 65

<220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 10
 5 tgcagagctc tggctttgg gcagcttct c 31

 <210> 11
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 11
 15 catgggatcc gcgactacc tagcaggac 29

 <210> 12
 <211> 31
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 12
 25 ctagccatgg gtgcttaagc tttcaatct g 31

 <210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 13
 35 agtaccatgg gaaacgacta ctgctagtgc 30

 <210> 14
 <211> 31
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 14
 45 ctggctcgag ttatttagca accaaggctg c 31

 <210> 15
 <211> 33
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 15
 55 tactggatcc gacgattacc aaaggaatgc tac 33

 <210> 16
 <211> 32
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <210> 16
 <211> 32
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 16
 5 tgatctcgag ttagctcagt ttctgccata tg 32

 <210> 17
 <211> 32
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 17
 15 gtcggatccg aggataaggt tgtgcaaact ag 32

 <210> 18
 <211> 32
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 18
 25 gcctctcgag ggataagcta gtctgtcttt gg 32

 <210> 19
 <211> 33
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 19
 35 ggcagagctc gatacagcaa gctataccat cac 33

 <210> 20
 <211> 35
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador de PCR

 <400> 20
 45 tatttctaga agttttatag gtgaaaacga taacc 35

 <210> 21
 <211> 1961
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Fragmento de fusión génica recombinante

 <400> 21
 55

ES 2 612 520 T3

tctgttccag gggccctgg gatccgcgac taccctagca ggacaaacag aagtacgggc	60
tgataatata ttacgcttag atatgacaga taaagaagca gttgaaaaat tcgctaacga	120
gcttaaaaat gaagtccata aaaactatcg tggtagtaat acttggcaaa agcttaccct	180
tatacttaat ggttatcaaa accttagaga acaaatagag accgagctaa aaaatagtga	240
acaaaaagta aaagagctta atgataaggt taatagtga actcaaggaa aacaagagtt	300
acagaatcag cttgagaaag aaaaagaaga gttagaaaca ctaaaaaaag agcttgaagc	360
tgagaaggct aaaggaactg gagaaacaga gaagcttcaa aaggaaattg aagcaaaaaa	420
tgcaatgatt tctgacctac aaaaacagct tgaggaaact aagcaaaggg ttcaagagtt	480
tgaagctgaa gtaggtaaat taatggccga aaaggcagac ctacaaaca aattaaatga	540
acaagagcag cttaacgcta agcttcaaaa agaaattgaa gacttaaagg ctgagattga	600
aaagcttaag caccatggg aaacgactac tgctagtgca tttgaaaata atgggacag	660
tcaacatctg aactggcaca tagatattcc acaagaatat acagttgaat taggagaacc	720
aattactata tcagatotta tgagtcaaat tacggttact cgtaaaggta gtaatgggac	780
tgtaaatgat ggagatactt ttgactttat ttogaatgga gatggttcaa gaggaattga	840
taccctgga gtaaaaatat ggtttgactt ttacaatgct gcgggtactt ccttttaac	900
tgatgaaatg ttagcttcgc ctacatatgc tgtaccgggg ggatcttata ctattaaagc	960
ttgggtattc tatgggaaaa atgataccaa aaagctcttc acatttaac taaaaattc	1020
caacagcaat aaaactgagt taaggaagtc gttagaggag gctaagctaa aactcagcca	1080
gocctgaagga acgtattctg atgaatcact gcaagccttg caatcagcgg ttactattgg	1140
taagacctat ttaaacagtg accctgatca aaatacagta gatcaatctg ttactactat	1200
tgattccgct attactagtc ttgttaatct taatgcttta aatgaagcta ttaatcaagc	1260
tacacctttt ataacagatg gcaaagagta tcctaaagaa gcgtatgacg gtcttgtgca	1320
aaagcttgca gggcagcta agcttcaaaa ttcatttggg ccttcacaag gagatgttga	1380
taaggctgcg actgatttaa cgcaagctct taogacgctt aagactgctg tagcgcata	1440
agccttagat caagccttgg ctaagctgtt agagctttac cgagaaaatc caaatcttgc	1500
tttgacatca gagtctttga aggaattgta caataaggcc attgaagcag caggtacctt	1560
ctatagaact gttaacaagg ataaagagag aaaagacatt tccctttatg agctagagcg	1620
ctacactaca gaaacaaatt cagttgttga tactatttta aaggtaaagg ctgcgattgc	1680
cgaagaagga aaggcaaaat tgcgttctgc tttagaccaa ttaaatgctc ttatcggaga	1740
aaatctagac ctatctccat atacagcagc ttctgctcaa gcctatacag accagctagc	1800

ES 2 612 520 T3

taaggctaag gaggtcgcag cagcgggtga gacagcttat gctcaggaga cagaaccgac 1860
agctattact aacagcttgg ttaaggtggt aaatgctaag aaatccctct cagatgccaa 1920
ggcagccttg gttgctaaat aactcgagcg gccgcacgt g 1961

5 <210> 22
<211> 649
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Proteína de fusión recombinante
<400> 22

ES 2 612 520 T3

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

ES 2 612 520 T3

Lys Glu Ile Glu Asp Leu Lys Ala Gln Ile Glu Lys Leu Lys His Pro
 195 200 205

Trp Glu Thr Thr Thr Ala Ser Ala Phe Glu Asn Asn Gly Thr Gly Gln
 210 215 220

His Leu Asn Trp His Ile Asp Ile Pro Gln Glu Tyr Thr Val Glu Leu
 225 230 235 240

Gly Glu Pro Ile Thr Ile Ser Asp Leu Met Ser Gln Ile Thr Val Thr
 245 250 255

Arg Lys Gly Ser Asn Gly Thr Val Asn Asp Gly Asp Thr Phe Asp Phe
 260 265 270

Ile Ser Asn Gly Asp Gly Ser Arg Gly Ile Asp Thr Pro Gly Val Lys
 275 280 285

Ile Trp Phe Asp Phe Tyr Asn Ala Ala Gly Thr Ser Phe Leu Thr Asp
 290 295 300

Glu Met Leu Ala Ser Pro Thr Tyr Ala Val Pro Gly Gly Ser Tyr Thr
 305 310 315 320

Ile Lys Ala Trp Val Phe Tyr Gly Lys Asn Asp Thr Lys Lys Leu Phe
 325 330 335

Thr Phe Lys Leu Lys Asn Ser Asn Ser Asn Lys Thr Glu Leu Arg Lys
 340 345 350

Ser Leu Glu Glu Ala Lys Leu Lys Leu Ser Gln Pro Glu Gly Thr Tyr
 355 360 365

Ser Asp Glu Ser Leu Gln Ala Leu Gln Ser Ala Val Thr Ile Gly Lys
 370 375 380

Thr Tyr Leu Asn Ser Asp Pro Asp Gln Asn Thr Val Asp Gln Ser Val
 385 390 395 400

Thr Thr Ile Asp Ser Ala Ile Thr Ser Leu Val Asn Leu Asn Ala Leu
 405 410 415

Asn Glu Ala Ile Asn Gln Ala Thr Pro Phe Ile Thr Asp Gly Lys Glu
 420 425 430

Tyr Pro Lys Glu Ala Tyr Asp Gly Leu Val Gln Lys Leu Ala Ala Ala
 435 440 445

Ala Lys Leu Gln Asn Ser Phe Gly Pro Ser Gln Gly Asp Val Asp Lys

ES 2 612 520 T3

450	455	460													
Ala	Ala	Thr	Asp	Leu	Thr	Gln	Ala	Leu	Thr	Thr	Leu	Lys	Thr	Ala	Val
465						470				475					480
Ala	His	Glu	Ala	Leu	Asp	Gln	Ala	Leu	Ala	Lys	Leu	Leu	Glu	Leu	Tyr
				485					490						495
Arg	Glu	Asn	Pro	Asn	Leu	Ala	Leu	Thr	Ser	Glu	Ser	Leu	Lys	Glu	Leu
			500					505					510		
Tyr	Asn	Lys	Ala	Ile	Glu	Ala	Ala	Gly	Thr	Phe	Tyr	Arg	Thr	Val	Asn
		515					520					525			
Lys	Asp	Lys	Glu	Arg	Lys	Asp	Ile	Ser	Leu	Tyr	Glu	Leu	Glu	Arg	Tyr
	530					535					540				
Thr	Thr	Glu	Thr	Asn	Ser	Val	Val	Asp	Thr	Ile	Leu	Lys	Val	Lys	Ala
545					550					555					560
Ala	Ile	Ala	Glu	Glu	Gly	Lys	Ala	Lys	Leu	Arg	Ser	Ala	Leu	Asp	Gln
				565					570					575	
Leu	Asn	Ala	Leu	Ile	Gly	Glu	Asn	Leu	Asp	Leu	Ser	Pro	Tyr	Thr	Ala
			580					585					590		
Ala	Ser	Ala	Gln	Ala	Tyr	Thr	Asp	Gln	Leu	Ala	Lys	Ala	Lys	Glu	Val
		595					600					605			
Ala	Ala	Ala	Gly	Glu	Thr	Ala	Tyr	Ala	Gln	Glu	Thr	Glu	Pro	Thr	Ala
	610					615					620				
Ile	Thr	Asn	Ser	Leu	Val	Lys	Val	Leu	Asn	Ala	Lys	Lys	Ser	Leu	Ser
625					630					635					640
Asp	Ala	Lys	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Lys							
				645											

<210> 23
 <211> 1962
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Fragmento de fusión génica recombinante

10

<400> 23

ES 2 612 520 T3

ctggaagttc	tgttccaggg	gccctggga	tccactaatc	ttagtgacaa	catcacatca	60
ttgacgggtg	cttcttcac	actccgagat	ggagagagaa	cgacggtaaa	ggttgcgttt	120
gatgacaaaa	aacagaaaat	caaggcaggg	gatacgatag	aggtcacctg	gctacaagt	180

ES 2 612 520 T3

ggtaatgtct acattcaggg cttaataaaa accataccgc ttaatattag aggggtagat 240
 gttggtacct tggaggtcac gctagacaag gctgttttca cattcaatca aatattgaa 300
 acaatgcatg atgtctctgg ttggggagag tttgatatta ctgtagaaa tgtgacacaa 360
 accaccgtg aaacatcagg aacgaccaca gtaaaggtag gcaatcgac tgctactatc 420
 actgttacta agcctgaggg aggcactggt accagctcat tttattataa gactggtgat 480
 atgcagccca atgatactga gcgtgtgaga tggttcctgc tgattaacaa caacaaggaa 540
 tgggtggcca atactgttac agtcgaagac gatattcaag gtggtcaaac cttggatag 600
 agcagctttg acatcacctg atctggttat cgtaacgagc gcttcggttg ggaaaacgct 660
 ctgacagagt ttcatacaac atttccaaat tctgtcatta cggcaacaga taatcacatt 720
 agtgtgoggt tagatcaata tgatgcctca caaaacactg tcaacattgc ttataagaca 780
 aagataacgg actttgacca aaaagaattt gccacaaca gtaaaatctg gtaccagatt 840
 ttatacaagg atcaggtatc gggccaagag tcaaaccacc aagtagccaa tatcaatgct 900
 aacggcgggg ttgatggcag tcgctatacc agctttactg tcaaggagct ctoggaaccc 960
 aatccatatc cagatgtgag gcgtttcctt gatgagaagt acgatggaga tgtggataaa 1020
 ttatctaaac aacttcaagg ttattttggg agttaaagag agtatataga gtttgaactt 1080
 aaaaatggca aacaaggtcc ttctagatta tctggtccgc caggataccc acttactcgt 1140
 gatttctccc gtaacttctt agaagaaaat actgcaaaat atttagatca attaagagaa 1200
 catctacagc acagatttag tgaactgag agcttaacaa gaaaattaga gaaagaaggc 1260
 ggtaccocgag gtccactgca ggaccagcca gcagcactaa aatatccaga acctagagac 1320
 tattttcttc atactcgtga aggtgatggt atttatgatg aggatataaa aagatatttt 1380
 gaggatttag aagcctattt aacagctaga cttggtggga ttgataaaaa agtagaagaa 1440
 gctgocccaa agccagagct cttagacgca gcaacagtgt tagagcctac aacagocctc 1500
 attagagaag ctgtaggga aatcaatcag ctgagtgatg actacgctga caatcaagag 1560
 cttcaggctg ttcttgctaa tgctggagtt gaggcacttg ctgcagatac tgttgatcag 1620
 gctaaagcag ctcttgacaa agcaaaggca gctgttgctg gtgttcagct tgatgaagca 1680
 agacgtgagg cttacagaac aatcaatgcc ttaagtgatc agcacaaaag cgatcaaaag 1740
 gttcagctag ctctagttgc tgcagcagct aaggtggcag atgctgcttc agttgatcaa 1800
 gtgaatgcag ccattaatga tgctcataca gctattgogg acattacagg agcagccttg 1860
 ttggaggcta aagaagctgc tatcaatgaa ctaaagcagt atggcattag tgattactat 1920
 gtgaccttaa tcaacaaagc caaataactc gagcggccgc at 1962

<210> 24
<211> 648
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Proteína de fusión recombinante

10

<400> 24

ES 2 612 520 T3

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Leu Gly Ser Thr Asn Leu Ser Asp
 1 5 10 15
 Asn Ile Thr Ser Leu Thr Val Ala Ser Ser Ser Leu Arg Asp Gly Glu
 20 25 30
 Arg Thr Thr Val Lys Val Ala Phe Asp Asp Lys Lys Gln Lys Ile Lys
 35 40 45
 Ala Gly Asp Thr Ile Glu Val Thr Trp Pro Thr Ser Gly Asn Val Tyr
 50 55 60
 Ile Gln Gly Phe Asn Lys Thr Ile Pro Leu Asn Ile Arg Gly Val Asp
 65 70 75 80
 Val Gly Thr Leu Glu Val Thr Leu Asp Lys Ala Val Phe Thr Phe Asn
 85 90 95
 Gln Asn Ile Glu Thr Met His Asp Val Ser Gly Trp Gly Glu Phe Asp
 100 105 110
 Ile Thr Val Arg Asn Val Thr Gln Thr Thr Ala Glu Thr Ser Gly Thr
 115 120 125
 Thr Thr Val Lys Val Gly Asn Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Thr Lys
 130 135 140
 Pro Glu Ala Gly Thr Gly Thr Ser Ser Phe Tyr Tyr Lys Thr Gly Asp
 145 150 155 160
 Met Gln Pro Asn Asp Thr Glu Arg Val Arg Trp Phe Leu Leu Ile Asn
 165 170 175
 Asn Asn Lys Glu Trp Val Ala Asn Thr Val Thr Val Glu Asp Asp Ile
 180 185 190
 Gln Gly Gly Gln Thr Leu Asp Met Ser Ser Phe Asp Ile Thr Val Ser
 195 200 205
 Gly Tyr Arg Asn Glu Arg Phe Val Gly Glu Asn Ala Leu Thr Glu Phe
 210 215 220
 His Thr Thr Phe Pro Asn Ser Val Ile Thr Ala Thr Asp Asn His Ile
 225 230 235 240

ES 2 612 520 T3

Ser Val Arg Leu Asp Gln Tyr Asp Ala Ser Gln Asn Thr Val Asn Ile
245 250 255

Ala Tyr Lys Thr Lys Ile Thr Asp Phe Asp Gln Lys Glu Phe Ala Asn
260 265 270

Asn Ser Lys Ile Trp Tyr Gln Ile Leu Tyr Lys Asp Gln Val Ser Gly
275 280 285

Gln Glu Ser Asn His Gln Val Ala Asn Ile Asn Ala Asn Gly Gly Val
290 295 300

Asp Gly Ser Arg Tyr Thr Ser Phe Thr Val Lys Glu Leu Ser Glu Pro
305 310 315 320

Asn Pro Tyr Pro Asp Val Arg Arg Phe Leu Asp Glu Lys Tyr Asp Gly
325 330 335

Asp Val Asp Lys Leu Ser Lys Gln Leu Gln Gly Tyr Phe Gly Ser Leu
340 345 350

Arg Glu Tyr Ile Glu Phe Glu Leu Lys Asn Gly Lys Gln Gly Pro Ser
355 360 365

Arg Leu Ser Gly Pro Pro Gly Tyr Pro Leu Thr Arg Asp Phe Ser Arg
370 375 380

Asn Phe Leu Glu Glu Asn Thr Ala Lys Tyr Leu Asp Gln Leu Arg Glu
385 390 395 400

His Leu Gln His Arg Phe Ser Glu Leu Glu Ser Leu Thr Arg Lys Leu
405 410 415

Glu Lys Glu Gly Gly Thr Arg Gly Pro Leu Gln Asp Gln Pro Ala Ala
420 425 430

Leu Lys Tyr Pro Glu Pro Arg Asp Tyr Phe Leu His Thr Arg Glu Gly
435 440 445

Asp Val Ile Tyr Asp Glu Asp Ile Lys Arg Tyr Phe Glu Asp Leu Glu
450 455 460

Ala Tyr Leu Thr Ala Arg Leu Gly Gly Ile Asp Lys Lys Val Glu Glu
465 470 475 480

Ala Ala Gln Lys Pro Glu Leu Leu Asp Ala Ala Thr Val Leu Glu Pro
485 490 495

ES 2 612 520 T3

Thr Thr Ala Phe Ile Arg Glu Ala Val Arg Glu Ile Asn Gln Leu Ser
500 505 510

Asp Asp Tyr Ala Asp Asn Gln Glu Leu Gln Ala Val Leu Ala Asn Ala
515 520 525

Gly Val Glu Ala Leu Ala Ala Asp Thr Val Asp Gln Ala Lys Ala Ala
530 535 540

Leu Asp Lys Ala Lys Ala Ala Val Ala Gly Val Gln Leu Asp Glu Ala
545 550 555 560

Arg Arg Glu Ala Tyr Arg Thr Ile Asn Ala Leu Ser Asp Gln His Lys
565 570 575

Ser Asp Gln Lys Val Gln Leu Ala Leu Val Ala Ala Ala Ala Lys Val
580 585 590

Ala Asp Ala Ala Ser Val Asp Gln Val Asn Ala Ala Ile Asn Asp Ala
595 600 605

His Thr Ala Ile Ala Asp Ile Thr Gly Ala Ala Leu Leu Glu Ala Lys
610 615 620

Glu Ala Ala Ile Asn Glu Leu Lys Gln Tyr Gly Ile Ser Asp Tyr Tyr
625 630 635 640

Val Thr Leu Ile Asn Lys Ala Lys
645

5

- <210> 25
- <211> 996
- <212> ADN
- <213> *Streptococcus equi*
- <400> 25

ES 2 612 520 T3

ctggaagttc tgttccaggg gccctggga tccgacgatt accaaaggaa tgctacggaa	60
gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca	120
ctaacacccg agcagtttgg atataataac gaagatgtga tocatgcgcc atatcttgc	180
catcaaggct ggtacgatat caccaaggcc ttogatggga aggataatct cttgtgtggc	240
gcagcaacgg caggtaatat gctgcattgg tggtttgatc aaaataaac agagattgaa	300
gcctatttaa gtaaacaccc tgaaaagcaa aaaatcattt ttaacaacca agagctattt	360
gatttgaaag ctgctatoga taccaaggac agtcaaacca atagtcagct ttttaattat	420
tttagagata aagcctttcc aaatctatca gcacgtcaac tcggggttat gcctgatctt	480
gttctagaca tgtttatcaa tggttactac ttaaagtgtt ttaaacaca gtctactgat	540
gtcaatcgac cttatcagga caaggacaaa cgaggtggta ttttcgatgc tgttttcacc	600
agaggagatc agacaacgct cttgacagct cgatcatgatt taaaaataa aggactaaat	660
gacatcagca ccattatcaa gcaagaactg actgaaggaa gagcccttgc tttatcacat	720
acctacgcca atgttagcat tagccatgtg attaacttgt ggggagctga ttttaatgct	780
gaaggaaacc ttgaggccat ctatgtcaca gactcagatg ctaatgcgtc tattggtatg	840
aaaaaatatt ttgtcggcat taatgctcat agacatgtcg ccatttctgc caagaaaata	900
gaaggagaaa acattggcgc tcaagtatta ggcttattta cgctttccag tggcaaggac	960
atatggcaga aactgagcta actcgagcgg ccgcat	996

<210> 26
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus equi*
 <400> 26

5

ES 2 612 520 T3

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

ES 2 612 520 T3

				165						170					175	
Gln	Ser	Thr	Asp	Val	Asn	Arg	Pro	Tyr	Gln	Asp	Lys	Asp	Lys	Arg	Gly	
			180					185					190			
Gly	Ile	Phe	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Arg	Gly	Asp	Gln	Thr	Thr	Leu	Leu	
		195					200					205				
Thr	Ala	Arg	His	Asp	Leu	Lys	Asn	Lys	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Ser	Thr	
	210					215					220					
Ile	Ile	Lys	Gln	Glu	Leu	Thr	Glu	Gly	Arg	Ala	Leu	Ala	Leu	Ser	His	
225					230					235					240	
Thr	Tyr	Ala	Asn	Val	Ser	Ile	Ser	His	Val	Ile	Asn	Leu	Trp	Gly	Ala	
				245					250					255		
Asp	Phe	Asn	Ala	Glu	Gly	Asn	Leu	Glu	Ala	Ile	Tyr	Val	Thr	Asp	Ser	
			260					265					270			
Asp	Ala	Asn	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Lys	Lys	Tyr	Phe	Val	Gly	Ile	Asn	
		275					280					285				
Ala	His	Arg	His	Val	Ala	Ile	Ser	Ala	Lys	Lys	Ile	Glu	Gly	Glu	Asn	
	290					295					300					
Ile	Gly	Ala	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Asp	
305					310					315					320	
Ile	Trp	Gln	Lys	Leu	Ser											
				325												

<210> 27
 <211> 1452
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Fragmento de fusión génica recombinante

10

<400> 27

ES 2 612 520 T3

ctggaagttc tgttccaggg gccoctggga tccactaatc ttagtgacaa catcacatca 60
 ttgacggttg cttcttcata actccgagat ggagagagaa cgacggtaaa gggtgcgttt 120
 gatgacaaaa aacagaaaat caaggcaggg gatacgatag aggtcacctg gcctacaagt 180
 ggtaatgtct acattcaggg ctttaataaa accataccgc ttaatattag aggggtagat 240
 gttggtacct tggaggtcac gctagacaag gctgttttca cattcaatca aaatattgaa 300
 acaatgcatg atgtctctgg ttggggagag tttgatatta ctgttagaaa tgtgacacaa 360
 accaccgctg aaacatcagg aacgaccaca gtaaaggtag gcaatcgcac tgctactatc 420
 actgttacta agcctgaggg aggcactggt accagctcat tttattataa gactggtgat 480
 atgcagccca atgatactga gcgtgtgaga tggttcctgc tgattaacaa caacaaggaa 540
 tgggtggcca atactgttac agtcgaagac gatattcaag gtggtcaaac cttgggatag 600
 agcagctttg acatcacctg atctggttat cgtaacgagc gcttcggttg ggaaaacgct 660
 ctgacagagt ttcatacaac atttccaaat tctgtcatta cggcaacaga taatcacatt 720
 agtgtgcygt tagatcaata tgatgcctca caaaacactg tcaacattgc ttataagaca 780
 aagataacgg actttgacca aaaagaattt gccaaacaac gtaaaaatctg gtaccagatt 840
 ttatacaagg atcaggtatc gggcaagag tcaaaccacc aagtagccaa tatcaatgct 900
 aacggcgggg ttgatggcag tcgctatacc agctttactg tcaaggagct cttagacgca 960
 gcaacagtgt tagagcctac aacagccttc attagagaag ctgttaggga aatcaatcag 1020
 ctgagtgatg actacgctga caatcaagag cttcaggctg ttcttgctaa tgctggagtt 1080
 gaggcacttg ctgcagatac tgttgatcag gctaaagcag ctcttgacaa agcaaaggca 1140
 gctgttgctg gtgttcagct tgatgaagca agacgtgagg cttacagaac aatcaatgcc 1200
 ttaagtgatc agcacaaaag cgatcaaaaag gttcagctag ctctagttgc tgcagcagct 1260
 aagggtggcag atgctgcttc agttgatcaa gtgaatgcag ccattaatga tgctcataca 1320
 gctattgcgg acattacagg agcagccttg ttggaggcta aagaagctgc tatcaatgaa 1380
 ctaaagcagt atggcattag tgattactat gtgaccttaa tcaacaaagc caaataactc 1440
 gagcgccgc at 1452

<210> 28
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Proteína de fusión recombinante

10

<400> 28

ES 2 612 520 T3

Glu Ile Asn Gln Leu Ser Asp Asp Tyr Ala Asp Asn Gln Glu Leu Gln
 340 345 350

Ala Val Leu Ala Asn Ala Gly Val Glu Ala Leu Ala Ala Asp Thr Val
 355 360 365

Asp Gln Ala Lys Ala Ala Leu Asp Lys Ala Lys Ala Ala Val Ala Gly
 370 375 380

Val Gln Leu Asp Glu Ala Arg Arg Glu Ala Tyr Arg Thr Ile Asn Ala
 385 390 395 400

Leu Ser Asp Gln His Lys Ser Asp Gln Lys Val Gln Leu Ala Leu Val
 405 410 415

Ala Ala Ala Ala Lys Val Ala Asp Ala Ala Ser Val Asp Gln Val Asn
 420 425 430

Ala Ala Ile Asn Asp Ala His Thr Ala Ile Ala Asp Ile Thr Gly Ala
 435 440 445

Ala Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Ala Ile Asn Glu Leu Lys Gln Tyr
 450 455 460

Gly Ile Ser Asp Tyr Tyr Val Thr Leu Ile Asn Lys Ala Lys
 465 470 475

<210> 29
 <211> 2322
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fragmento de fusión génica recombinante

<400> 29

5

10

ES 2 612 520 T3

ctggaagttc tgttccaggg gccctgga tccgacgatt accaaaggaa tgctacggaa	60
gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca	120
ctaacacccg agcagtttcc atataataac gaagatgtga tccatgcgcc atatcttgct	180
catcaaggct ggtacgatat caccaaggcc ttcgatggga aggataatct cttgtgtggc	240
gcagcaacgg caghtaatat gctgcattgg tggtttgatc aaaataaaac agagattgaa	300
gcctatttaa gtaaaccacc tgaaaagcaa aaaatcattt ttaacaacca agagctattt	360
gatttgaaag ctgctatcga taccaaggac agtcaaacca atagtcagct ttttaattat	420
tttagagata aagcctttcc aaatctatca gcacgtcaac tcggggttat gcctgatctt	480
gttotagaca tgtttatcaa tggttactac ttaaagtgtt ttaaaacaca gtctactgat	540

ES 2 612 520 T3

gtcaatcgac cttatcagga caaggacaaa ogaggtggta ttttcgatgc tgttttcacc 600
 agaggagatc agacaacgct cttgacagct cgtcatgatt taaaaataa aggactaaat 660
 gacatcagca ccattatcaa gcaagaactg actgaaggaa gagcccttgc tttatcacat 720
 acctacgcca atgttagcat tagccatgtg attaacttgt ggggagctga ttttaatgct 780
 gaaggaaacc ttgaggccat ctatgtcaca gactcagatg ctaatgcgtc tattggtatg 840
 aaaaaatatt ttgtcggcat taatgctcat agacatgtog ccatttctgc caagaaaata 900
 gaaggagaaa acattggcgc tcaagtatta ggcttattta cgctttccag tggcaaggac 960
 atatggcaga aactgagccc atgggaaacg actactgcta gtgcatttga aaataatggg 1020
 acaggtcaac atctgaactg gcacatagat attccacaag aatatacagt tgaattagga 1080
 gaaccaatta ctatctcaga tcttatgagt caaattacgg ttactcgtaa aggtagtaat 1140
 gggactgtta atgatggaga tacttttgac tttatttoga atggagatgg ttcaagagga 1200
 attgataccc ctggagtaaa aatatggttt gacttttaca atgctgcggg tacttccttt 1260
 ttaactgatg aaatgtagc ttcgcctaca tatgctgtac cggggggatc ttatactatt 1320
 aaagcttggg tattctatgg gaaaaatgat accaaaaagc tcttcacatt taaactaaaa 1380
 aattccaaca gcaataaaac tgagttaagg aagtcgtagg aggaggctaa gctaaaactc 1440
 agccagcctg aaggaacgta ttctgatgaa tcaactgcaag ccttgcaatc agcggttact 1500
 attggaaga cctatttaa cagtgaccct gatcaaaata cagtagatca atctgttact 1560
 actattgatt ccgctattac tagtcttgtt aatcttaatg ctttaaatga agctattaat 1620
 caagctacac cttttataac agatggcaaa gagtatocca aagaagcgtg tgacggtctt 1680
 gtgcaaaaagc ttgcagcggc agctaagcct caaaattcat ttggctcttc acaaggagat 1740
 gttgataagg ctgcgactga tttaacgcaa gctcttacga cgcttaagac tgctgtagcg 1800
 catgaagcct tagatcaagc cttggctaag ctggttagagc tttaccgaga aatccaaat 1860
 cttgctttga catcagagtc tttgaaggaa ttgtacaata aggccattga agcagcaggt 1920
 accttctata gaactgttaa caaggataaa gagagaaaag acatttccct ttatgagcta 1980
 gagcgcctaca ctacagaaac aaattcagtt gttgatacta ttttaaaggt aaaggctgcg 2040
 attgccgaag aaggaaaggc aaaattgctt tctgctttag accaattaaa tgctcttacc 2100
 ggagaaaatc tagacctatc tccatataca gcagcttctg ctcaagccta tacagaccag 2160
 ctagctaagg ctaaggaggt cgcagcagcg ggtgagacag cttatgctca ggagacagaa 2220
 ccgacagcta ttactaacag cttggttaag gtgttaaatg ctaagaaatc cctctcagat 2280
 gccaaggcag ccttggttgc taaataactc gagcggcgcg at 2322

<210> 30
 <211> 768
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión recombinante

5

<400> 30

ES 2 612 520 T3

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Leu Gly Ser Asp Asp Tyr Gln Arg
 1 5 10 15
 Asn Ala Thr Glu Ala Tyr Ala Lys Glu Val Pro His Gln Ile Thr Ser
 20 25 30
 Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Leu Thr Pro Glu Gln Phe Arg Tyr
 35 40 45
 Asn Asn Glu Asp Val Ile His Ala Pro Tyr Leu Ala His Gln Gly Trp
 50 55 60
 Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Lys Asp Asn Leu Leu Cys Gly
 65 70 75 80
 Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys
 85 90 95
 Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro Glu Lys Gln Lys Ile
 100 105 110
 Ile Phe Asn Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys Ala Ala Ile Asp Thr
 115 120 125
 Lys Asp Ser Gln Thr Asn Ser Gln Leu Phe Asn Tyr Phe Arg Asp Lys
 130 135 140
 Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly Val Met Pro Asp Leu
 145 150 155 160
 Val Leu Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Tyr Leu Asn Val Phe Lys Thr
 165 170 175
 Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp Lys Asp Lys Arg Gly
 180 185 190
 Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Thr Thr Leu Leu
 195 200 205
 Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu Asn Asp Ile Ser Thr
 210 215 220
 Ile Ile Lys Gln Glu Leu Thr Glu Gly Arg Ala Leu Ala Leu Ser His
 225 230 235 240

ES 2 612 520 T3

Thr Tyr Ala Asn Val Ser Ile Ser His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala
 245 250 255
 Asp Phe Asn Ala Glu Gly Asn Leu Glu Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser
 260 265 270
 Asp Ala Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Ile Asn
 275 280 285
 Ala His Arg His Val Ala Ile Ser Ala Lys Lys Ile Glu Gly Glu Asn
 290 295 300
 Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Ser Gly Lys Asp
 305 310 315 320
 Ile Trp Gln Lys Leu Ser Pro Trp Glu Thr Thr Thr Ala Ser Ala Phe
 325 330 335
 Glu Asn Asn Gly Thr Gly Gln His Leu Asn Trp His Ile Asp Ile Pro
 340 345 350
 Gln Glu Tyr Thr Val Glu Leu Gly Glu Pro Ile Thr Ile Ser Asp Leu
 355 360 365
 Met Ser Gln Ile Thr Val Thr Arg Lys Gly Ser Asn Gly Thr Val Asn
 370 375 380
 Asp Gly Asp Thr Phe Asp Phe Ile Ser Asn Gly Asp Gly Ser Arg Gly
 385 390 395 400
 Ile Asp Thr Pro Gly Val Lys Ile Trp Phe Asp Phe Tyr Asn Ala Ala
 405 410 415
 Gly Thr Ser Phe Leu Thr Asp Glu Met Leu Ala Ser Pro Thr Tyr Ala
 420 425 430
 Val Pro Gly Gly Ser Tyr Thr Ile Lys Ala Trp Val Phe Tyr Gly Lys
 435 440 445
 Asn Asp Thr Lys Lys Leu Phe Thr Phe Lys Leu Lys Asn Ser Asn Ser
 450 455 460
 Asn Lys Thr Glu Leu Arg Lys Ser Leu Glu Glu Ala Lys Leu Lys Leu
 465 470 475 480
 Ser Gln Pro Glu Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ser Leu Gln Ala Leu Gln
 485 490 495

ES 2 612 520 T3

Ser Ala Val Thr Ile Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Ser Asp Pro Asp Gln
500 505 510

Asn Thr Val Asp Gln Ser Val Thr Thr Ile Asp Ser Ala Ile Thr Ser
515 520 525

Leu Val Asn Leu Asn Ala Leu Asn Glu Ala Ile Asn Gln Ala Thr Pro
530 535 540

Phe Ile Thr Asp Gly Lys Glu Tyr Pro Lys Glu Ala Tyr Asp Gly Leu
545 550 555 560

Val Gln Lys Leu Ala Ala Ala Ala Lys Leu Gln Asn Ser Phe Gly Pro
565 570 575

Ser Gln Gly Asp Val Asp Lys Ala Ala Thr Asp Leu Thr Gln Ala Leu
580 585 590

Thr Thr Leu Lys Thr Ala Val Ala His Glu Ala Leu Asp Gln Ala Leu
595 600 605

Ala Lys Leu Leu Glu Leu Tyr Arg Glu Asn Pro Asn Leu Ala Leu Thr
610 615 620

Ser Glu Ser Leu Lys Glu Leu Tyr Asn Lys Ala Ile Glu Ala Ala Gly
625 630 635 640

Thr Phe Tyr Arg Thr Val Asn Lys Asp Lys Glu Arg Lys Asp Ile Ser
645 650 655

Leu Tyr Glu Leu Glu Arg Tyr Thr Thr Glu Thr Asn Ser Val Val Asp
660 665 670

Thr Ile Leu Lys Val Lys Ala Ala Ile Ala Glu Glu Gly Lys Ala Lys
675 680 685

Leu Arg Ser Ala Leu Asp Gln Leu Asn Ala Leu Ile Gly Glu Asn Leu
690 695 700

Asp Leu Ser Pro Tyr Thr Ala Ala Ser Ala Gln Ala Tyr Thr Asp Gln
705 710 715 720

Leu Ala Lys Ala Lys Glu Val Ala Ala Ala Gly Glu Thr Ala Tyr Ala
725 730 735

Gln Glu Thr Glu Pro Thr Ala Ile Thr Asn Ser Leu Val Lys Val Leu
740 745 750

Asn Ala Lys Lys Ser Leu Ser Asp Ala Lys Ala Ala Leu Val Ala Lys

755

760

765

5
<210> 31
<211> 3004
<212> ADN
<213> *Streptococcus equi*

<400> 31

ES 2 612 520 T3

ctggaagttc tgttccaggg gccctggga tccgaggata aggttgtgca aactagtcca 60
 tcagtctctg ctattgatga cctacattac ctgtcggaaa acagtaaaaa agaatttaag 120
 gaggggttat caaaggcagg agaagtacct gaaaagctaa aggatatttt atccaaggca 180
 cagcaggcag ataagcaggc aaaggttctt gcagaaatga aggttcctga aaaaatagcc 240
 atgaagcctt taaaggggcc tctttatggg ggctatttta ggacttggca tgataaaaca 300
 tcagatccgg ctgaaaagga taaggttaat tctatgggag aattgcctaa ggaggttgac 360
 ttagcctttg ttttccatga ttggaccaag gattatagct ttttctggca agaattggcg 420
 accaagcatg tgccaacgct gaacaagcag ggaacacgtg tgattogtac cattccatgg 480
 cggttccttg caggcgggtga tcatagtggg attgctgaag atacgcaaaa atacccaaat 540
 actccagagg gaaataaggc cttggcaaag gctattgtag atgaatacgt ttataaatat 600
 aatcttgatg gtttagatgt tgatattgag cgggatagca ttocaaaagt aatggaaaa 660
 gagagtaacg aaaatattca gcgctctatt gctgtttttg aagaaattgg caagcttatt 720
 gggccaaagg gcgctgacaa gtcacgtttg ttcattatgg atagcaccta catggctgac 780
 aagaacccat tgattgagcg cggtgcccaa tatattgatt tgctgcttgt gcaggtttat 840
 ggcaactcaag gtgagaaggg agattgggat ccagtcgcta gaaaacctga aaagacaatg 900
 gaggaacggt gggaatcgta tagcaaatac attcgtcctg agcagtacat ggttggtttt 960
 tctttctatg aggaatatgc gggcagtggt aacctctggt atgatattaa tgagaggaaa 1020
 gatgatcata atccgttaaa ttcagagata gctggtactc gtgctgagcg ttatgcaaaa 1080
 tggcagccta agacaggtgg tgtcaagggg gggattttct cttatgcatg tgatcgcatg 1140
 ggtgtagcgc atcaacctaa aaaagtctca gatgatgaga aaagaactaa caaggctata 1200
 aaggatataa cagatggtat tgtcaaatca gattataagg tttctaaggc cttgaagaag 1260
 gttatggaaa atgacaaatc ctatgagctg attgatcaga aagattttcc agacaaggct 1320
 ttgcgagaag cagttattgc acaggttggg agcagaagag gggattttaga gcggttcaat 1380
 ggaaccctgc gcttagacaa tccggatata aagagtttag aaggcctgaa taagcttaaa 1440
 aaactagcta agctagagct aatcggctca tcacaaatca caaagctgga tagcttagtc 1500
 ctacctgcaa atgctaagcc gaccaaggat acgctggcca atgttottga agcctacgac 1560
 agcgctaaga aggaagagac taaggcgatt ccacaggtgg ctctgaccat ttctggctca 1620
 actggcttga aggaattaa tcttgctggc tttgatcgtg atagottggc tgggaattgac 1680

ES 2 612 520 T3

gcagctagcc taacctctct tgaaaagggtg gatctctcta gtaataagct ggacttagca	1740
gctggtacgg aaaatcgta gattcttgat accatgctgg caacagtgac taagcatggc	1800
ggtggttagcg aaaagacggt tgtatttgat catcaaaagc ctactggtct ttatcctgat	1860
acttatggca ctaagagcct tcagttacca gtagcaaatg atacaattga tttgcagget	1920
aagcttttat ttggaacagt taccaatcag ggcacgctaa tcaatagcga agctgactat	1980
aaggcttatac aggagcagga aatagcaggt caccgttttg ttgattcaag ctatgattac	2040
aaagcctttg cagtgcacta caaggactat aagatcaagg tgactgactc aaccttaggt	2100
gtcactgatc acaaggactt atccactagc aaggaggaga cctacaagggt tgaattcttt	2160
agccctacta atagcactaa gcctgtgcat gaggctaagg ttgtcgttgg tgcggaaaaa	2220
accatgatgg ttaacctagc agagggagca actgtgattg gtggtgatgc agatccaaca	2280
aatgcaaaaa aagtgtttga tggtttgctc aataatgata caacaattct gtcaactagc	2340
aataaagctt ctatcatttt tgaacttaa gagcctggct tagtcaagta ttggcgtttc	2400
tttaatgaca gcaaaattag taaagctgac tgtattaagg aggccaagct tgaagccttt	2460
gttggccatc ttgaagctgg ctcaaaggta aaggatagct tggaaaaatc atcaaatgg	2520
gtaacagttt cagattattc aggagaggac caagagtta gccagccggt aaacaacatt	2580
ggtgccaaat attggagaat aacagttgat actaaggag gagcgttaca ttggccatca	2640
cttctgagc ttcaaatcat tggttatcaa ttaccggctg cggatcttgt gatggcaatg	2700
ctagctactg cagaggagct atctcagcaa aaagacaagt tctotcaaga gcagcttaag	2760
gagctogaag tcaaaatagc tgccttaaag gctgctttag atagtaagat gtttaatgcc	2820
gatgctatta acgctagtac tgctgatctg aaggcttatg ttgataagct tttagctgat	2880
agaactgatc aggaaaaagt agctaaagca gctaaagttg agcagcctgt ggctactgac	2940
ataaaagaaa atactgagcc agaaaatcca aagacagact agcttatccc tcgagcggcc	3000
gcat	3004

<210> 32
 <211> 993
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus equi*
 <400> 32

5

ES 2 612 520 T3

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Leu Gly Ser Glu Asp Lys Val Val
1 5 10 15

Gln Thr Ser Pro Ser Val Ser Ala Ile Asp Asp Leu His Tyr Leu Ser
20 25 30

Glu Asn Ser Lys Lys Glu Phe Lys Glu Gly Leu Ser Lys Ala Gly Glu
35 40 45

ES 2 612 520 T3

Val Pro Glu Lys Leu Lys Asp Ile Leu Ser Lys Ala Gln Gln Ala Asp
50 55 60

Lys Gln Ala Lys Val Leu Ala Glu Met Lys Val Pro Glu Lys Ile Ala
65 70 75 80

Met Lys Pro Leu Lys Gly Pro Leu Tyr Gly Gly Tyr Phe Arg Thr Trp
85 90 95

His Asp Lys Thr Ser Asp Pro Ala Glu Lys Asp Lys Val Asn Ser Met
100 105 110

Gly Glu Leu Pro Lys Glu Val Asp Leu Ala Phe Val Phe His Asp Trp
115 120 125

Thr Lys Asp Tyr Ser Phe Phe Trp Gln Glu Leu Ala Thr Lys His Val
130 135 140

Pro Thr Leu Asn Lys Gln Gly Thr Arg Val Ile Arg Thr Ile Pro Trp
145 150 155 160

Arg Phe Leu Ala Gly Gly Asp His Ser Gly Ile Ala Glu Asp Thr Gln
165 170 175

Lys Tyr Pro Asn Thr Pro Glu Gly Asn Lys Ala Leu Ala Lys Ala Ile
180 185 190

Val Asp Glu Tyr Val Tyr Lys Tyr Asn Leu Asp Gly Leu Asp Val Asp
195 200 205

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

Asn Ile Gln Arg Ser Ile Ala Val Phe Glu Glu Ile Gly Lys Leu Ile
225 230 235 240

Gly Pro Lys Gly Ala Asp Lys Ser Arg Leu Phe Ile Met Asp Ser Thr
245 250 255

Tyr Met Ala Asp Lys Asn Pro Leu Ile Glu Arg Gly Ala Gln Tyr Ile
260 265 270

Asp Leu Leu Leu Val Gln Val Tyr Gly Thr Gln Gly Glu Lys Gly Asp
275 280 285

Trp Asp Pro Val Ala Arg Lys Pro Glu Lys Thr Met Glu Glu Arg Trp
290 295 300

ES 2 612 520 T3

Glu Ser Tyr Ser Lys Tyr Ile Arg Pro Glu Gln Tyr Met Val Gly Phe
 305 310 315 320

 Ser Phe Tyr Glu Glu Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Trp Tyr Asp Ile
 325 330 335

 Asn Glu Arg Lys Asp Asp His Asn Pro Leu Asn Ser Glu Ile Ala Gly
 340 345 350

 Thr Arg Ala Glu Arg Tyr Ala Lys Trp Gln Pro Lys Thr Gly Gly Val
 355 360 365

 Lys Gly Gly Ile Phe Ser Tyr Ala Ile Asp Arg Asp Gly Val Ala His
 370 375 380

 Gln Pro Lys Lys Val Ser Asp Asp Glu Lys Arg Thr Asn Lys Ala Ile
 385 390 395 400

 Lys Asp Ile Thr Asp Gly Ile Val Lys Ser Asp Tyr Lys Val Ser Lys
 405 410 415

 Ala Leu Lys Lys Val Met Glu Asn Asp Lys Ser Tyr Glu Leu Ile Asp
 420 425 430

 Gln Lys Asp Phe Pro Asp Lys Ala Leu Arg Glu Ala Val Ile Ala Gln
 435 440 445

 Val Gly Ser Arg Arg Gly Asp Leu Glu Arg Phe Asn Gly Thr Leu Arg
 450 455 460

 Leu Asp Asn Pro Asp Ile Lys Ser Leu Glu Gly Leu Asn Lys Leu Lys
 465 470 475 480

 Lys Leu Ala Lys Leu Glu Leu Ile Gly Leu Ser Gln Ile Thr Lys Leu
 485 490 495

 Asp Ser Leu Val Leu Pro Ala Asn Ala Lys Pro Thr Lys Asp Thr Leu
 500 505 510

 Ala Asn Val Leu Glu Ala Tyr Asp Ser Ala Lys Lys Glu Glu Thr Lys
 515 520 525

 Ala Ile Pro Gln Val Ala Leu Thr Ile Ser Gly Leu Thr Gly Leu Lys
 530 535 540

 Glu Leu Asn Leu Ala Gly Phe Asp Arg Asp Ser Leu Ala Gly Ile Asp
 545 550 555 560

 Ala Ala Ser Leu Thr Ser Leu Glu Lys Val Asp Leu Ser Ser Asn Lys

ES 2 612 520 T3

Ser Leu Glu Lys Ser Ser Lys Trp Val Thr Val Ser Asp Tyr Ser Gly
 835 840 845

Glu Asp Gln Glu Phe Ser Gln Pro Leu Asn Asn Ile Gly Ala Lys Tyr
 850 855 860

Trp Arg Ile Thr Val Asp Thr Lys Gly Gly Arg Tyr Asn Trp Pro Ser
 865 870 875 880

Leu Pro Glu Leu Gln Ile Ile Gly Tyr Gln Leu Pro Ala Ala Asp Leu
 885 890 895

Val Met Ala Met Leu Ala Thr Ala Glu Glu Leu Ser Gln Gln Lys Asp
 900 905 910

Lys Phe Ser Gln Glu Gln Leu Lys Glu Leu Glu Val Lys Ile Ala Ala
 915 920 925

Leu Lys Ala Ala Leu Asp Ser Lys Met Phe Asn Ala Asp Ala Ile Asn
 930 935 940

Ala Ser Thr Ala Asp Leu Lys Ala Tyr Val Asp Lys Leu Leu Ala Asp
 945 950 955 960

Arg Thr Asp Gln Glu Lys Val Ala Lys Ala Ala Lys Val Glu Gln Pro
 965 970 975

Val Ala Thr Asp Ile Lys Glu Asn Thr Glu Pro Glu Asn Pro Lys Thr
 980 985 990

Asp

- <210> 33
- <211> 2715
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Fragmento de fusión génica recombinante
- <400> 33

ctggaagttc tgttccaggg gccctggga tccactaatc ttagtgacaa catcacatca 60

ttgacgggttg cttcttcac actccgagat ggagagagaa cgacggtaaa ggttgcgttt 120

gatgacaaaa aacagaaaat caaggcaggg gatacgatag aggtcacctg gcctacaagt 180

ggtaatgtct acattcaggg cttaataaaa accataccgc ttaatattag aggggtagat 240

gttggtacct tggaggtcac gctagacaag gctgttttca cattcaatca aatattgaa 300

ES 2 612 520 T3

acaatgcatg atgtctctgg ttggggagag tttgatatta ctgtagaaa tgtgacacaa 360
 accaccgctg aaacatcagg aacgaccaca gtaaaggtag gcaatcgcac tgctactatc 420
 actgttacta agcctgaggc aggcactggc accagctcat tttattataa gactgggtgat 480
 atgcagccca atgatactga gcgtgtgaga tggttcctgc tgattaacaa caacaaggaa 540
 tgggtggcca atactgttac agtcgaagac gatattcaag gtggtcaaac cttggatag 600
 agcagctttg acatcacctg atctggttat cgtaacgagc gcttcgcttg ggaaaacgct 660
 ctgacagagt ttcatacaac atttccaaat tctgtcatta cggcaacaga taatcacatt 720
 agtgtgoggt tagatcaata tgatgcctca caaaacactg tcaacattgc ttataagaca 780
 aagataacgg actttgacca aaaagaattt gccacaaca gtaaatctg gtaccagatt 840
 ttatacaagg atcaggtatc ggtcaagag tcaaaccacc aagtagccaa tatcaatgct 900
 aacggcgggg ttgatggcag tcgctatacc agctttactg tcaaggagct cgatacagca 960
 agctatacca tcaactgttg gggagctaca gcaggtcaca cctatgaggc ttatcagatt 1020
 ttcaagggtg acttgtttga cagtacccta tcaaacatca catggggagg tgggtttaca 1080
 ccttttgaat ttgatggttc aaaagacgct gctaagattg cagagggatt gaaggaagca 1140
 aatgcagctg cctttgccaa ggaagcaggt aagcacttga cagcaaccat tgcaggaaca 1200
 ggaacacatg caatcacctg taacgaggct ggctactacc tcatcaagga caaaaatgat 1260
 totcaaacag gcaagcatga cgcctacacc tcatttgtcc tgaaggttgt taaaaacacc 1320
 agcttcaaac caaaatctgc tatcccaaca gtccttaaaa aggtcaagga ccgtaatgac 1380
 aagacaggtc ttgagacagg ctggcaagat tcagctgact atgacaaaaa tgacaaggtg 1440
 ccattccagc taaccgcaac cctacogtca aattacgatg cctttcaaga atactacctt 1500
 gaattttag ataccttacc aaaagggcta agctacaaca aagacgcca ggtctatgtg 1560
 gttaatggag atactcgtca agatattact aattcattta cagttagtga agatggttca 1620
 tcttttaaaa tcaataacct aaaggctgtt cagggagtaa caataacagc taccagtaag 1680
 atcgttgtcg aatacactgc taccctcaat gaccaagcgg ccatcggcaa aaaaggaat 1740
 ccaaacgaag ttgctttgaa atactcaaac gatccaaacg ctcttgaaa aggagaggag 1800
 tctccaaaag gggagacacc aaaagacaag gttatcgttt tcacctataa aacttctaga 1860
 ttatctggtc cgccaggata cccacttact cgtgatttct cccgtaactt cctagaagaa 1920
 aatactgcaa aatatttaga tcaattaaga gaacatctac agcacagatt tagtgaactt 1980
 gagagcttaa caagaaaatt agagaaagaa ggoggtaccc gaggtccact gcaggaccag 2040
 ccagcagcac taaaatatcc agaacctaga gactattttc ttcatactcg tgaaggtgat 2100
 gttatztatg atgaggatat aaaaagatat tttgaggatt tagaagccta tttaacagct 2160
 agacttggtg ggattgataa aaaagtagaa gaagctgccc aaaagccaga gctcttagac 2220
 gcagcaacag tgttagagcc tacaacagcc ttcattagag aagctgtag ggaaatcaat 2280

ES 2 612 520 T3

cagctgagtg atgactacgc tgacaatcaa gagcttcagg ctgttcttgc taatgctgga	2340
gttgaggcac ttgctgcaga tactgttgat caggctaaag cagctcttga caaagcaaag	2400
gcagctggtg ctggtgttca gottgatgaa gcaagacgtg aggottacag aacaatcaat	2460
gccttaagtg atcagcacia aagcgatcaa aaggttcagc tagctctagt tgotgcagca	2520
gctaaggtgg cagatgctgc ttcagttgat caagtgaatg cagccattaa tgatgctcat	2580
acagctattg cggacattac aggagcagcc ttgttgagg ctaaagaagc tgctatcaat	2640
gaactaaagc agtatggcat tagtgattac tatgtgacct taatcaacia agccaaataa	2700
ctcgagcggc cgcac	2715

- 5 <210> 34
- <211> 899
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Proteína de fusión recombinante

- <400> 34

ES 2 612 520 T3

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

ES 2 612 520 T3

145		150		155		160													
Met	Gln	Pro	Asn	Asp	Thr	Glu	Arg	Val	Arg	Trp	Phe	Leu	Leu	Ile	Asn				
				165					170						175				
Asn	Asn	Lys	Glu	Trp	Val	Ala	Asn	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Asp	Ile				
			180					185					190						
Gln	Gly	Gly	Gln	Thr	Leu	Asp	Met	Ser	Ser	Phe	Asp	Ile	Thr	Val	Ser				
		195					200					205							
Gly	Tyr	Arg	Asn	Glu	Arg	Phe	Val	Gly	Glu	Asn	Ala	Leu	Thr	Glu	Phe				
	210					215					220								
His	Thr	Thr	Phe	Pro	Asn	Ser	Val	Ile	Thr	Ala	Thr	Asp	Asn	His	Ile				
225					230					235					240				
Ser	Val	Arg	Leu	Asp	Gln	Tyr	Asp	Ala	Ser	Gln	Asn	Thr	Val	Asn	Ile				
				245					250					255					
Ala	Tyr	Lys	Thr	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Asp	Gln	Lys	Glu	Phe	Ala	Asn				
			260					265					270						
Asn	Ser	Lys	Ile	Trp	Tyr	Gln	Ile	Leu	Tyr	Lys	Asp	Gln	Val	Ser	Gly				
		275					280					285							
Gln	Glu	Ser	Asn	His	Gln	Val	Ala	Asn	Ile	Asn	Ala	Asn	Gly	Gly	Val				
	290					295					300								
Asp	Gly	Ser	Arg	Tyr	Thr	Ser	Phe	Thr	Val	Lys	Glu	Leu	Asp	Thr	Ala				
305					310					315					320				
Ser	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Glu	Gly	Ala	Thr	Ala	Gly	His	Thr	Tyr	Glu				
				325					330					335					
Ala	Tyr	Gln	Ile	Phe	Lys	Gly	Asp	Leu	Phe	Asp	Ser	Thr	Leu	Ser	Asn				
			340					345					350						
Ile	Thr	Trp	Gly	Gly	Gly	Val	Thr	Pro	Phe	Glu	Phe	Asp	Gly	Ser	Lys				
		355					360					365							
Asp	Ala	Ala	Lys	Ile	Ala	Glu	Gly	Leu	Lys	Glu	Ala	Asn	Ala	Ala	Ala				
	370					375					380								
Phe	Ala	Lys	Glu	Ala	Gly	Lys	His	Leu	Thr	Ala	Thr	Ile	Ala	Gly	Thr				
385					390					395					400				
Gly	Thr	His	Ala	Ile	Thr	Val	Asn	Glu	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Lys				
				405					410					415					

ES 2 612 520 T3

Asp Lys Asn Asp Ser Gln Thr Gly Lys His Asp Ala Tyr Thr Ser Phe
 420 425 430
 Val Leu Lys Val Val Lys Asn Thr Ser Phe Lys Pro Lys Ser Ala Ile
 435 440 445
 Pro Thr Val Leu Lys Lys Val Lys Asp Arg Asn Asp Lys Thr Gly Leu
 450 455 460
 Glu Thr Gly Trp Gln Asp Ser Ala Asp Tyr Asp Lys Asn Asp Lys Val
 465 470 475 480
 Pro Phe Gln Leu Thr Ala Thr Leu Pro Ser Asn Tyr Asp Ala Phe Gln
 485 490 495
 Glu Tyr Tyr Leu Glu Phe Val Asp Thr Leu Ser Lys Gly Leu Ser Tyr
 500 505 510
 Asn Lys Asp Ala Lys Val Tyr Val Val Asn Gly Asp Thr Arg Gln Asp
 515 520 525
 Ile Thr Asn Ser Phe Thr Val Ser Glu Asp Gly Ser Ser Phe Lys Ile
 530 535 540
 Asn Asn Leu Lys Ala Val Gln Gly Val Thr Ile Thr Ala Thr Ser Lys
 545 550 555 560
 Ile Val Val Glu Tyr Thr Ala Thr Leu Asn Asp Gln Ala Ala Ile Gly
 565 570 575
 Lys Lys Gly Asn Pro Asn Glu Val Ala Leu Lys Tyr Ser Asn Asp Pro
 580 585 590
 Asn Ala Leu Gly Lys Gly Glu Glu Ser Pro Lys Gly Glu Thr Pro Lys
 595 600 605
 Asp Lys Val Ile Val Phe Thr Tyr Lys Thr Ser Arg Leu Ser Gly Pro
 610 615 620
 Pro Gly Tyr Pro Leu Thr Arg Asp Phe Ser Arg Asn Phe Leu Glu Glu
 625 630 635 640
 Asn Thr Ala Lys Tyr Leu Asp Gln Leu Arg Glu His Leu Gln His Arg
 645 650 655
 Phe Ser Glu Leu Glu Ser Leu Thr Arg Lys Leu Glu Lys Glu Gly Gly
 660 665 670

ES 2 612 520 T3

Thr Arg Gly Pro Leu Gln Asp Gln Pro Ala Ala Leu Lys Tyr Pro Glu
675 680 685

Pro Arg Asp Tyr Phe Leu His Thr Arg Glu Gly Asp Val Ile Tyr Asp
690 695 700

Glu Asp Ile Lys Arg Tyr Phe Glu Asp Leu Glu Ala Tyr Leu Thr Ala
705 710 715 720

Arg Leu Gly Gly Ile Asp Lys Lys Val Glu Glu Ala Ala Gln Lys Pro
725 730 735

Glu Leu Leu Asp Ala Ala Thr Val Leu Glu Pro Thr Thr Ala Phe Ile
740 745 750

Arg Glu Ala Val Arg Glu Ile Asn Gln Leu Ser Asp Asp Tyr Ala Asp
755 760 765

Asn Gln Glu Leu Gln Ala Val Leu Ala Asn Ala Gly Val Glu Ala Leu
770 775 780

Ala Ala Asp Thr Val Asp Gln Ala Lys Ala Ala Leu Asp Lys Ala Lys
785 790 795 800

Ala Ala Val Ala Gly Val Gln Leu Asp Glu Ala Arg Arg Glu Ala Tyr
805 810 815

Arg Thr Ile Asn Ala Leu Ser Asp Gln His Lys Ser Asp Gln Lys Val
820 825 830

Gln Leu Ala Leu Val Ala Ala Ala Ala Lys Val Ala Asp Ala Ala Ser
835 840 845

Val Asp Gln Val Asn Ala Ala Ile Asn Asp Ala His Thr Ala Ile Ala
850 855 860

Asp Ile Thr Gly Ala Ala Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Ala Ile Asn
865 870 875 880

Glu Leu Lys Gln Tyr Gly Ile Ser Asp Tyr Tyr Val Thr Leu Ile Asn
885 890 895

Lys Ala Lys

<210> 35
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 612 520 T3

<220>
<223> Cebador de PCR

5 <400> 35
gcatccatgg atacagcaag ctatacca 28

<210> 36
<211> 31
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de PCR

15 <400> 36
caattatfff ttcccagata ggagctcagc t 31

<210> 37
20 <211> 1283
<212> ADN
<213> *Streptococcus equi*

25 <400> 37

ES 2 612 520 T3

ccatggatac agcaagctat accatcaactg ttgagggagc tacagcaggt cacacctatg 60
 aggcttatca gattttcaag ggtgacttgt ttgacagtac octatcaaac atcacatggg 120
 gaggtggtgt tacacctttt gaatttgatg gttcaaaaga cgctgctaag attgcagagg 180
 gattgaagga agcaaagca gctgcctttg ccaaggaagc aggtaagcac ttgacagcaa 240
 ccattgcagg aacaggaaca catgcaatca ccgtaaagca ggctggctac tacctcatca 300
 aggacaaaaa tgattctcaa acaggcaagc atgacgccta cacctcattt gtcctgaagg 360
 ttgttaaaaa caccagcttc aaaccaaaat ctgctatccc aacagtcctt aaaaaggcca 420
 aggaccgtaa tgacaagaca ggtcttgaga caggctggca agattcagct gactatgaca 480
 aaaatgacaa ggtgccattc cagctaaccg caaccctacc gtcaaattac gatgcctttc 540
 aagaatacta ccttgaattt gtagatacct tatcaaaagg gctaagctac aacaagacg 600
 ccaaggtcta tgtgggtaat ggagatactc gtcaagatat tactaattca tttacagtta 660
 gtgaagatgg ttcctctttt aaaatcaata acctaaaggc tgttcagggg gtaacaataa 720
 cagctaccag taagatcgtt gtcgaataca ctgctaccct caatgaccaa gcggccatcg 780
 gcaaaaaagg aatccaac gaagttgctt tgaaatactc aaacgatcca aacgctcttg 840
 gaaaaggaga ggagtctcca aaaggggaga caccaaaaga caaggttatc gttttcacct 900
 ataaaactat catcaataag gttgatcaag atcaaaaagc octaaaagggt gcaggcttta 960
 ccctttataa gctgggcaaa ggtgataatg gcgaggaaaa atatcaataa gtccaagaaa 1020
 ttaaagcagg ggatacaact agctttgagt ttgttgact tgacgctggt gattacaagc 1080
 tcagcgaaac aacaacacct ggcggttaca aactattgc agatgtcatg ttcagcattg 1140
 tagcgagca tgaaaccgag tcagacgatc ctcaagtgac tagcctaacc gttgacaaag 1200

 caactggctt cactgctgat acagaagctg gtaccgtatc cgcaactatt gttaataaaa 1260
 ggtctatcct cgagcccggg tgc 1283

<210> 38
 <211> 426
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus equi*

5

<400> 38

ES 2 612 520 T3

Met Asp Thr Ala Ser Tyr Thr Ile Thr Val Glu Gly Ala Thr Ala Gly
1 5 10 15

His Thr Tyr Glu Ala Tyr Gln Ile Phe Lys Gly Asp Leu Phe Asp Ser
20 25 30

Thr Leu Ser Asn Ile Thr Trp Gly Gly Gly Val Thr Pro Phe Glu Phe
35 40 45

Asp Gly Ser Lys Asp Ala Ala Lys Ile Ala Glu Gly Leu Lys Glu Ala
50 55 60

Asn Ala Ala Ala Phe Ala Lys Glu Ala Gly Lys His Leu Thr Ala Thr
65 70 75 80

Ile Ala Gly Thr Gly Thr His Ala Ile Thr Val Asn Glu Ala Gly Tyr
85 90 95

Tyr Leu Ile Lys Asp Lys Asn Asp Ser Gln Thr Gly Lys His Asp Ala
100 105 110

Tyr Thr Ser Phe Val Leu Lys Val Val Lys Asn Thr Ser Phe Lys Pro
115 120 125

Lys Ser Ala Ile Pro Thr Val Leu Lys Lys Val Lys Asp Arg Asn Asp
130 135 140

Lys Thr Gly Leu Glu Thr Gly Trp Gln Asp Ser Ala Asp Tyr Asp Lys
145 150 155 160

Asn Asp Lys Val Pro Phe Gln Leu Thr Ala Thr Leu Pro Ser Asn Tyr
165 170 175

Asp Ala Phe Gln Glu Tyr Tyr Leu Glu Phe Val Asp Thr Leu Ser Lys
180 185 190

Gly Leu Ser Tyr Asn Lys Asp Ala Lys Val Tyr Val Val Asn Gly Asp
195 200 205

ES 2 612 520 T3

Thr Arg Gln Asp Ile Thr Asn Ser Phe Thr Val Ser Glu Asp Gly Ser
 210 215 220
 Ser Phe Lys Ile Asn Asn Leu Lys Ala Val Gln Gly Val Thr Ile Thr
 225 230 235 240
 Ala Thr Ser Lys Ile Val Val Glu Tyr Thr Ala Thr Leu Asn Asp Gln
 245 250 255
 Ala Ala Ile Gly Lys Lys Gly Asn Pro Asn Glu Val Ala Leu Lys Tyr
 260 265 270
 Ser Asn Asp Pro Asn Ala Leu Gly Lys Gly Glu Glu Ser Pro Lys Gly
 275 280 285
 Glu Thr Pro Lys Asp Lys Val Ile Val Phe Thr Tyr Lys Thr Ile Ile
 290 295 300
 Asn Lys Val Asp Gln Asp Gln Lys Ala Leu Lys Gly Ala Gly Phe Thr
 305 310 315 320
 Leu Tyr Lys Leu Val Lys Gly Asp Asn Gly Glu Glu Lys Tyr Gln Ile
 325 330 335
 Val Gln Glu Ile Lys Ala Gly Asp Thr Thr Ser Phe Glu Phe Val Gly
 340 345 350
 Leu Asp Ala Gly Asp Tyr Lys Leu Ser Glu Thr Thr Thr Pro Gly Gly
 355 360 365
 Tyr Asn Thr Ile Ala Asp Val Met Phe Ser Ile Val Ala Gln His Glu
 370 375 380
 Thr Glu Ser Asp Asp Pro Gln Leu Thr Ser Leu Thr Val Asp Lys Ala
 385 390 395 400
 Thr Gly Phe Thr Ala Asp Thr Glu Ala Gly Thr Val Ser Ala Thr Ile
 405 410 415
 Val Asn Lys Arg Ser Ile Leu Glu Pro Gly
 420 425

- 5
- <210> 39
 - <211> 29
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia artificial
 - <220>
 - <223> Cebador de PCR

ES 2 612 520 T3

<400> 39
gcagccatgg agagtctgac gagtggtga 29

5 <210> 40
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador de PCR

<400> 40
tcacctcgag tctagctca cgtcataag c 31

15 <210> 41
<211> 1301
<212> ADN
<213> *Streptococcus equi*

20 <400> 41

ES 2 612 520 T3

ccatggagag tctgacgagt gttgagcctg ctgatgggctc ggtcatggctc aagtcagagg 60
 ctgctgacca aggctcaaat gagctaccag aagctactga cattagtgat attgctggta 120
 tttctgatgt gactaagggtg tcagctgctg tcaatgctga tactgtcaag gaagttcagc 180
 cagtagctgt acctcttgta gaggatcagg cgcgatgagga aactacagac cagtctcagc 240
 cttcatcctc gatagtgtct gttacgacag acagctctct agagacacca gaagctacaa 300
 gctcagagga gccgatagcg gagcagacct tgcggctgca tttcaagacc ctgccagctc 360
 aagacctatc ctgccttggt ctttgggtgt gggacgatgt tgagacacca totgatcagc 420
 tgggaggctg gccgactggg gctaccaatt ttagtctagc gaagacagat gactatggct 480
 attacatgga cgttaagott tcagoccaatc aagoccaataa ggtagcttt ttgatcaata 540
 acactaaggg agacaatctg acggggcgatc gaaccataga ccttctcagc cctaagatga 600
 atgaggctctg gattgatggc caggagctgt cttactatcg gccgctggct cagggtata 660
 tccgtatcaa ttattatcgc agtgatggcc attatgacaa caaatcgctc tggctttggg 720
 gaagtgctga tgcgtcaatg actagtcagc agggcgcttg gccagatggc attgatttta 780
 agcaggctcg tgcatatggc gcttatatag atgtcaagct agctgatacc aatgagctag 840
 gctttctctt gotagatgag cgtcagacag gtgacgctgt taaaattcag cccaatgatt 900
 atatTTTTaa agattTaaag aatcacaccc aaatTTTctt gaaagacgag gatccaacca 960
 tttatacgaa cccttatttt gtttaatacag ttagattaat cgggtgctcag caggtcagcc 1020
 caagcagtat tgaggcgagc tttacgactc tagcagatgt ggataaggaa agcctTTTaa 1080
 aagaattaaa aatcagcact gacagtaagg aagcagttgc tattactgat atcaccttag 1140
 atgaaaagac tcataaggct gtcacacag gtgattttag tcaagcagtg gccacttata 1200
 cggtgacctt tcatcatgag agcttccagg ctaggccaaa ttggcaatac aaggatagcc 1260
 tgtatgctta tgacggtgag ctaggactcg agcccggtg c 1301

<210> 42
 <211> 432
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus equi*
 <400> 42

5

ES 2 612 520 T3

Met Glu Ser Leu Thr Ser Val Glu Pro Ala Asp Gly Ala Val Met Val
1 5 10 15

Lys Ser Glu Ala Ala Asp Gln Gly Ser Asn Glu Leu Pro Glu Ala Thr
20 25 30

Asp Ile Ser Asp Ile Ala Gly Ile Ser Asp Val Thr Lys Val Ser Ala
35 40 45

Ala Val Asn Ala Asp Thr Val Lys Glu Val Gln Pro Val Ala Val Pro
50 55 60

Leu Val Glu Asp Gln Ala His Glu Glu Thr Thr Asp Gln Ser Gln Pro
65 70 75 80

Ser Ser Ser Ile Val Ser Val Thr Thr Asp Ser Ser Leu Glu Thr Pro
85 90 95

Glu Ala Thr Ser Ser Glu Glu Pro Ile Ala Glu Gln Thr Leu Arg Leu
100 105 110

His Phe Lys Thr Leu Pro Ala Gln Asp Leu Ser Ser Leu Gly Leu Trp
115 120 125

Val Trp Asp Asp Val Glu Thr Pro Ser Asp Gln Leu Gly Gly Trp Pro
130 135 140

Thr Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Ala Lys Thr Asp Asp Tyr Gly Tyr
145 150 155 160

Tyr Met Asp Val Lys Leu Ser Ala Asn Gln Ala Asn Lys Val Ser Phe
165 170 175

Leu Ile Asn Asn Thr Lys Gly Asp Asn Leu Thr Gly Asp Arg Thr Ile
180 185 190

Asp Leu Leu Ser Pro Lys Met Asn Glu Val Trp Ile Asp Gly Gln Glu
195 200 205

Leu Ser Tyr Tyr Arg Pro Leu Ala Gln Gly Tyr Ile Arg Ile Asn Tyr
210 215 220

Tyr Arg Ser Asp Gly His Tyr Asp Asn Lys Ser Leu Trp Leu Trp Gly

ES 2 612 520 T3

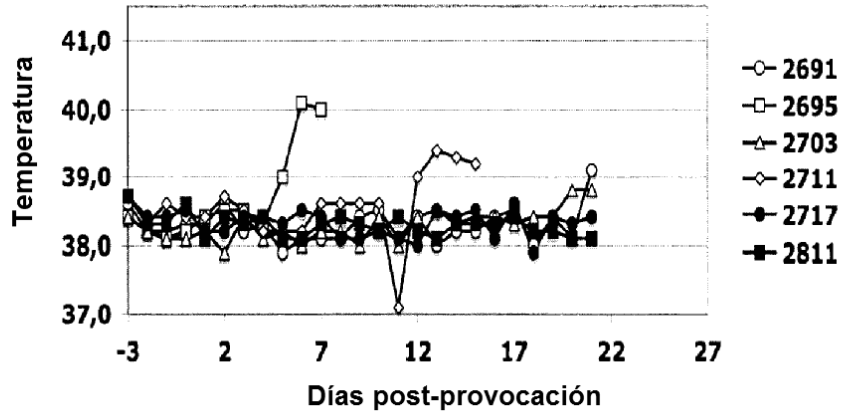
225					230						235					240
Ser	Ala	Asp	Ala	Ser	Met	Thr	Ser	Gln	Gln	Gly	Ala	Trp	Pro	Asp	Gly	
				245					250					255		
Ile	Asp	Phe	Lys	Gln	Val	Gly	Arg	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Ile	Asp	Val	Lys	
			260					265					270			
Leu	Ala	Asp	Thr	Asn	Glu	Leu	Gly	Phe	Leu	Leu	Leu	Asp	Glu	Arg	Gln	
		275					280					285			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

REIVINDICACIONES

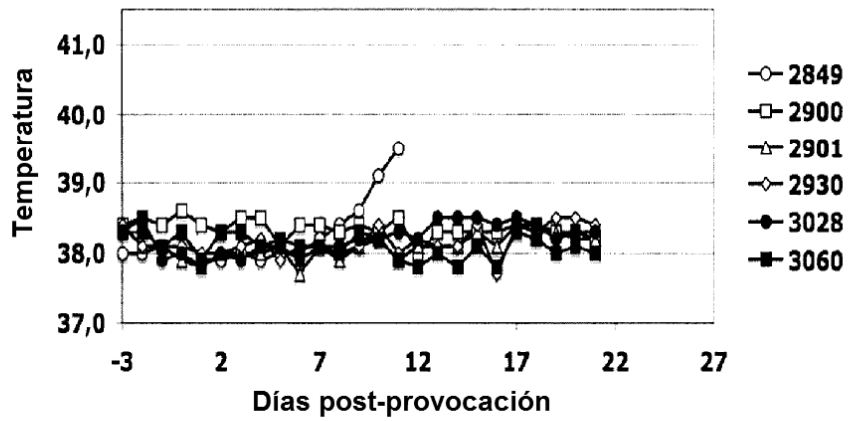
- 5 1. Una composición antigénica que comprende una pluralidad de componentes antigénicos derivados de antígenos de *Streptococcus equi* subsp. *equi*, en la que la composición antigénica se selecciona entre:
- 10 (A) una composición que comprende (i) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 22, comenzando a partir del aminoácido 12, (ii) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 24, comenzando a partir del aminoácido 12, y (iii) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 26, comenzando a partir del aminoácido 12;
- 15 (B) una composición que comprende (i) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 28, comenzando a partir del aminoácido 12, (ii) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 30, comenzando a partir del aminoácido 12, y (iii) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 32, comenzando a partir del aminoácido 12;
- 20 (C) una composición que comprende (i) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 34, comenzando a partir del aminoácido 12, (ii) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 30, comenzando a partir del aminoácido 12, y (iii) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 32, comenzando a partir del aminoácido 12; y
- 25 (D) (i) una composición que comprende un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 34, comenzando a partir del aminoácido 12, y (ii) un polipéptido de fusión que consiste en la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 30, comenzando a partir del aminoácido 12.
- 30 2. La composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición es la composición (A).
3. Una composición de vacuna para proteger a mamíferos no humanos contra infección por *Streptococcus equi*, que comprende la composición antigénica de la reivindicación 1 o 2 como componente inmunizador, un vehículo farmacéuticamente aceptable, y preferentemente un adyuvante, y que preferentemente se proporciona en una forma fisiológicamente administrable, preferentemente una forma que es administrable mediante inoculación intramuscular, intradérmica, subcutánea o intranasal.
- 35 4. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la vacuna es capaz de proteger a mamíferos susceptibles contra infección por *Streptococcus equi*, especialmente caballos contra la adenitis equina causada por *Streptococcus equi* subsp. *equi*, y que preferentemente es capaz de estimular respuestas de anticuerpos séricos, mucosales y/o bronquiales dirigidos con antígenos de *Streptococcus equi* en mamíferos susceptibles a *Streptococcus equi*, especialmente caballos.
- 40 5. Una composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, para uso en tratamiento profiláctico o terapéutico de infecciones causadas por *Streptococcus equi*.
- 45 6. Un método para la producción de un antisuero, método que comprende administrar una composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 a un hospedador mamífero no humano para producir anticuerpos en dicho hospedador y recuperar antisuero que contiene dichos anticuerpos producidos en dicho hospedador.

Figura 1A
(Paneles A, B y C)

Strangvacc 2 (Estudio I)



Strangvacc 3/4 (Estudio I)



Placebo (Estudio I)

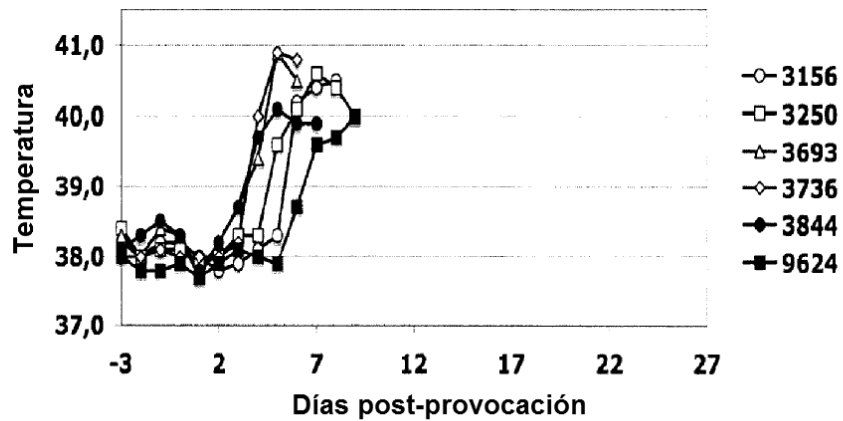
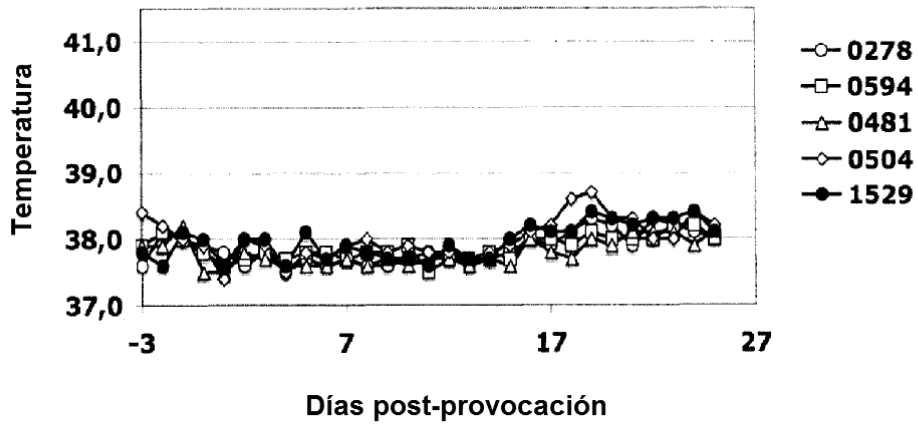
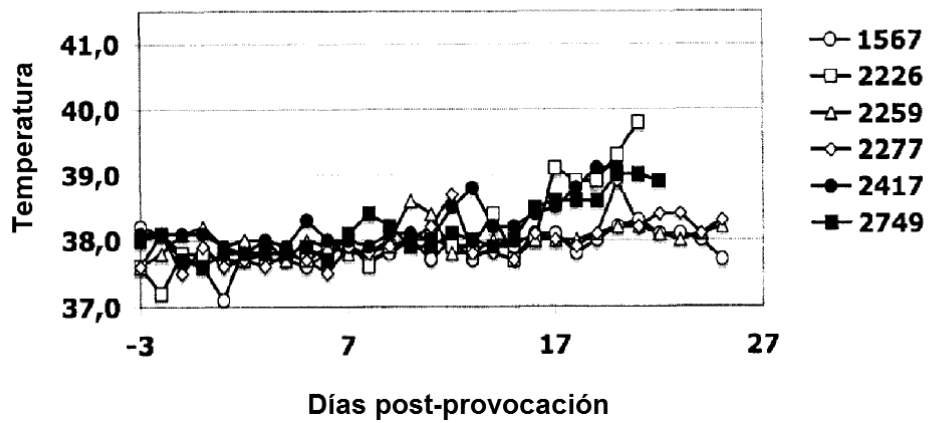


Figura 1B
(Paneles D, E y F)

Strangvacc 3/4 (Estudio II)



Strangvacc 5 (Estudio II)



Strangvacc 7 (Estudio II)

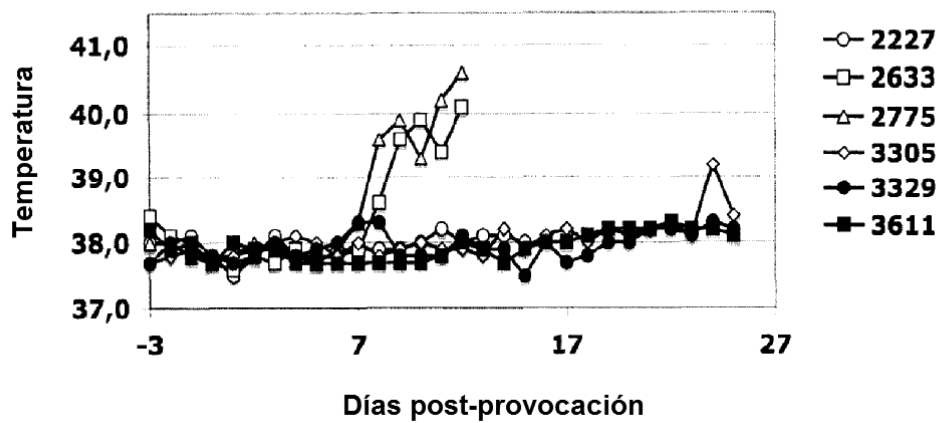


Figura 1C
(Paneles G y H)

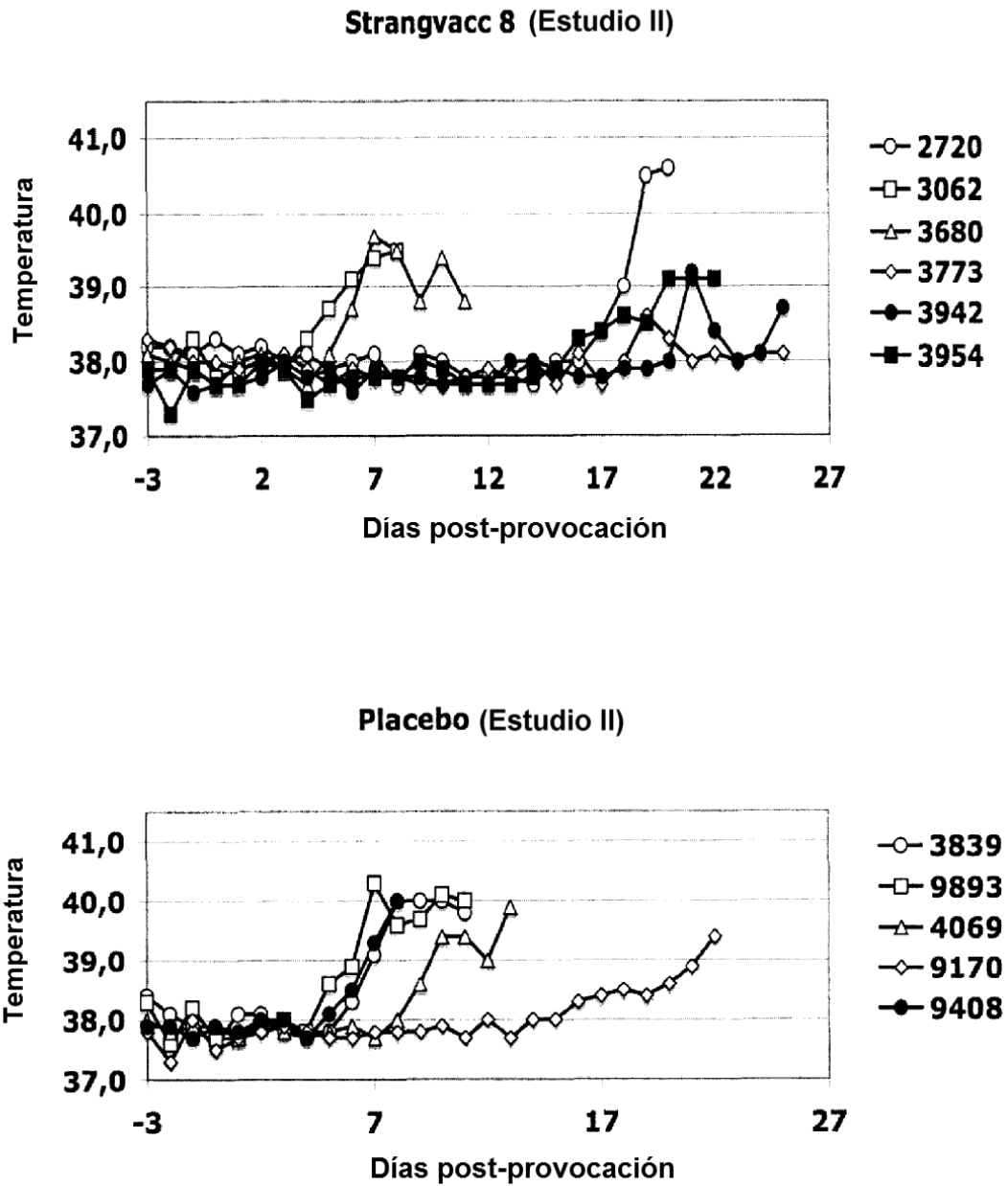


Figura 2

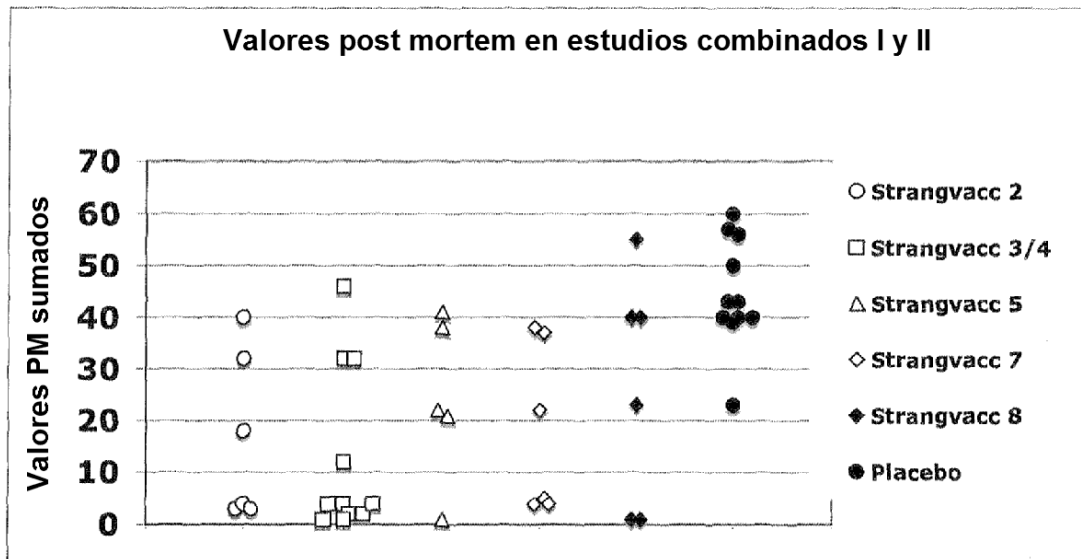


Figura 3

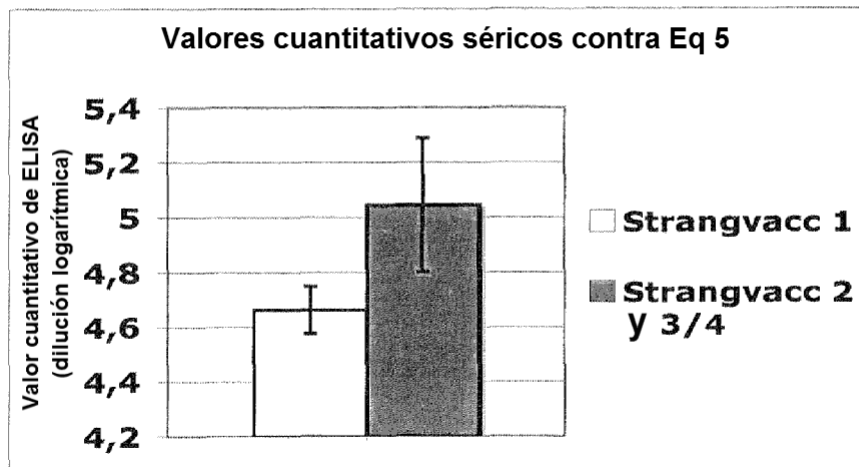
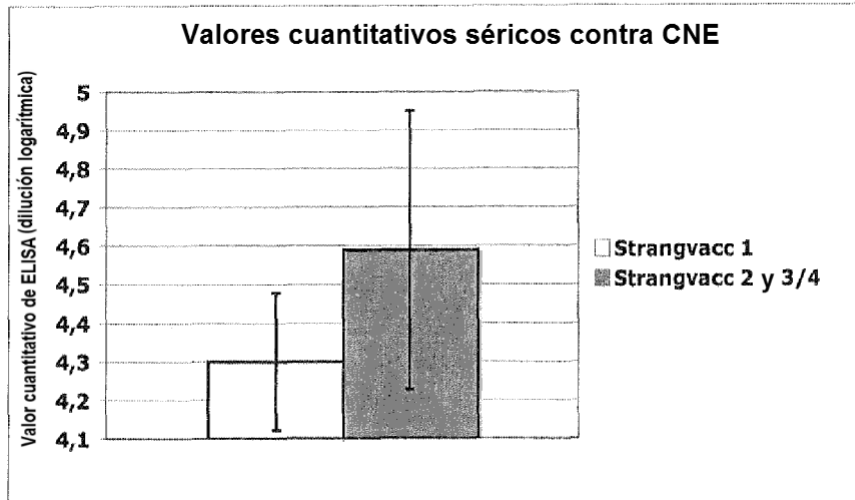


Figura 4A

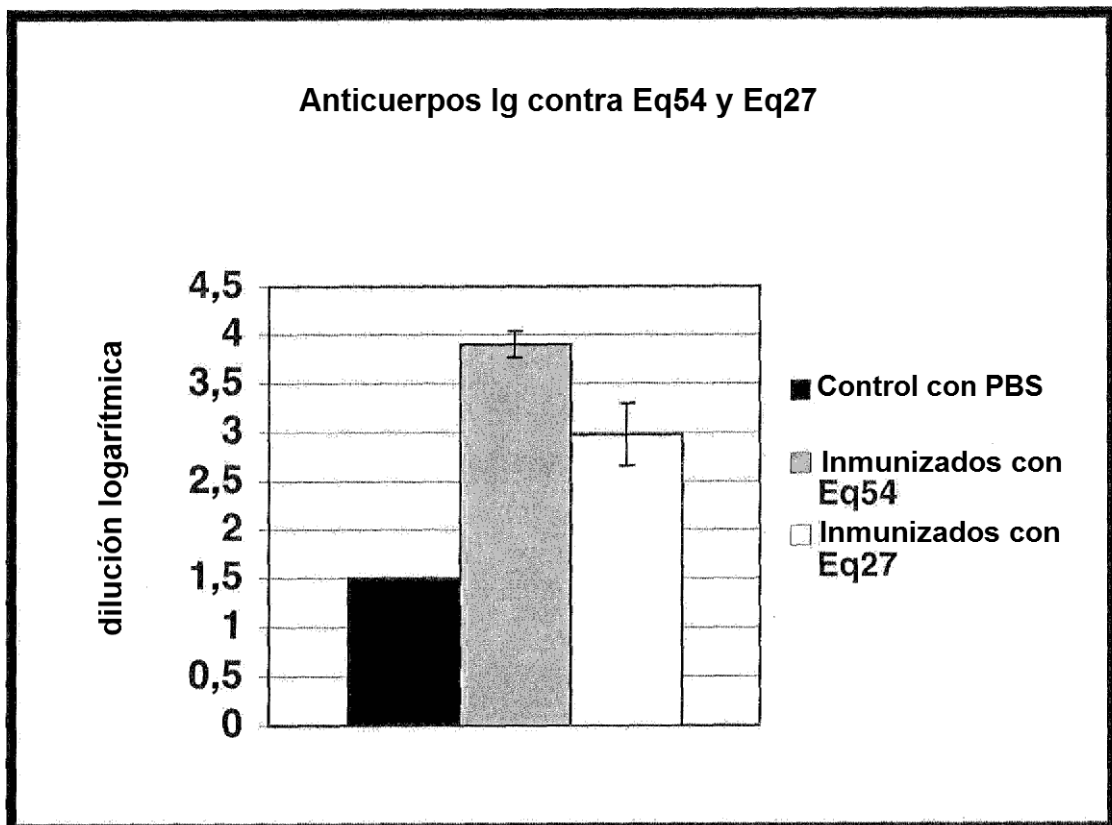


Figura 4B

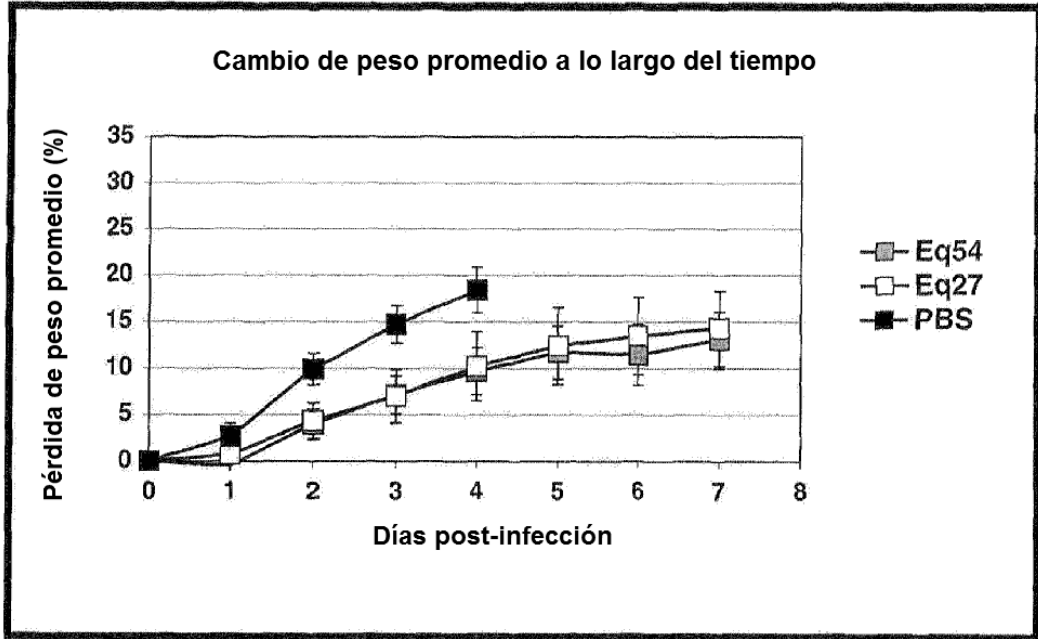


Figura 4C

