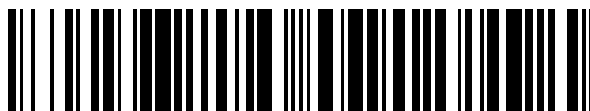


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 801**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.06.2013 PCT/US2013/047282**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14004361**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2013 E 13735511 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2866828**

54 Título: **Vacunas atenuadas contra Streptococcus suis y procedimientos de fabricación y uso de las mismas**

30 Prioridad:

27.06.2012 US 201261664935 P

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

09.04.2018

73 Titular/es:

**MERIAL, INC. (100.0%)
3239 Satellite Blvd.
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**BEY, RUSSELL, F.;
LAWRENCE, PAULRAJ, KIRUBAKARAN;
SIMONSON, RANDY,R.;
SIRIGIREDDY, KAMESH, REDDY y
MCKEOWN, DANIELLE, A.**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 662 801 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

Vacunas atenuadas contra *Streptococcus suis* y procedimientos de fabricación y uso de las mismas

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere en general a vacunas bacterianas atenuadas, particularmente las que proporcionan una protección amplia, segura y eficaz para animales porcinos contra infecciones/enfermedad causada por *Streptococcus suis*. La presente descripción se refiere además a procedimientos de producción de bacterias atenuadas y a la identificación de variaciones de ácido nucleico que se asocian con una disminución de la virulencia de las bacterias atenuadas.

[0002] La presente invención se refiere por tanto a composiciones inmunogénicas o de vacuna que comprenden las bacterias de la invención; por ejemplo, bacterias atenuadas vivas. Las bacterias son bacterias *S. suis* atenuadas vivas. La invención se refiere por lo tanto además a procedimientos para preparar y/o formular tales composiciones; es decir, mezclar opcionalmente las bacterias con un portador, excipiente, diluyente o vehículo veterinaria o farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante y/o estabilizante. Por lo tanto, la invención también se refiere al uso de las bacterias en la formulación de tales composiciones.

20 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0003] *Streptococcus suis* es un coco Gram positivo que predominantemente coloniza cerdos. Aunque los cerdos adultos actúan como portadores asintomáticos, pueden causar meningitis mortal, artritis séptica y bronconeumonía en lechones. Los cerdos adultos suelen portar *S. suis* como comensal en sus criptas amigdalinas y las vías respiratorias superiores, pero las bacterias también se han aislado de los tractos gastrointestinal y genital. Casi todos los cerdos adultos sirven como reservorios de *S. suis* y este patógeno afecta a las industrias de cerdos en todo el mundo.

[0004] Además *S. suis* también coloniza una amplia variedad de especies de mamíferos y aves [Gottschalk et al., 2007]. Además, *S. suis* es un importante agente zoonótico [Perch et al., 1968], aunque la infección humana con *S. suis* es rara en Europa y América del Norte. La mayoría de estos casos en América del Norte y Europa están casi exclusivamente relacionados con la exposición ocupacional a los cerdos o productos del cerdo. Sin embargo, la incidencia de la infección humana con *S. suis* es mayor en el sureste de Asia y China. Aunque la meningitis es la manifestación más común en los seres humanos, de vez en cuando también se observa septicemia y endocarditis.

[0005] De los 33 serotipos conocidos de *S. suis*, el serotipo 2 se asocia más frecuentemente con meningitis y artritis en cerdos de América del Norte y Europa [Fittipaldi et al., 2009; Higgins y Gottschalk, 2006]. Los diversos factores de virulencia de *S. suis* incluyen; cápsula, proteína de unión a fibronectina/fibrinógeno, factor de tipo opacidad del suero y modificaciones de los ácidos lipoteicoicos de la pared celular y peptidoglicano [Baums et al., 2006; Chabot-Roy et al., 2006; de Greef et al., 2002; Fittipaldi et al., 2008a, b.; Smith et al., 1999]. Además, los factores de virulencia compartidos entre diversas cepas del mismo serotipo muestran una amplia variación [Berthelot-Herault et al., 2005; Quessy et al., 1995; Vecht et al., 1992]. Los marcadores fenotípicos para la virulencia de *S. suis* incluyen el factor de hemólisis, suilisina (codificada por *sly*), la proteína LPXTG conocida como proteína liberada de muramidasa [MRP, 136 kDa, codificada por el gen *mrp*] y el factor extracelular de proteína secretada [EF, 110 kDa, codificada por el gen *epf*]. Hay una fuerte correlación positiva entre la presencia de estas proteínas de virulencia y los fenotipos virulentos en cepas de Eurasia de *S. suis* [Gottschalk et al., 2007; Vecht et al., 1991]. En estos continentes, las cepas del serotipo 2 MRP⁺EF⁺SLY⁺ se aíslan principalmente de cerdos enfermos que muestran signos clínicos graves de la enfermedad, mientras que las cepas MRP⁻EF⁻SLY⁻ han sido frecuentemente aisladas de cerdos sanos [Allgaier et al., 2001; Vecht et al., 1992].

[0006] Se han investigado células completas y numerosas proteínas de *S. suis* como posibles candidatos vacunales. La inmunización con una bacterina de tipo natural protegió completamente contra la estimulación con el serotipo homólogo, mientras que el mutante no encapsulado no consiguió proporcionar protección [Wisselink et al., 2002]. En un estudio realizado por Li et al, SAO recombinante (proteína de superficie de *S. suis*) en combinación con Quil A protegió contra la enfermedad del serotipo 2 de *S. suis* en cerdos. La inmunización intramuscular con SAO provocó respuestas de anticuerpos humorales significativas, pero eran predominantemente IgG2. La inmunización con SAO recombinante también indujo anticuerpos opsonofagocíticos [Li et al., 2007]. La inmunización de los lechones con suilisina purificada de la cepa de *S. suis* P1/7 (serotipo 2), aumentó los títulos de anticuerpos neutralizantes, lo que sugiere que SLY podría funcionar como antígeno protector [Jacobs et al., 1996]. Sin embargo, ninguno de estos experimentos utilizó serotipos heterólogos para estimular cerdos vacunados con estos antígenos. En un estudio de Baums et al, la bacterina de serotipo 2 de *S. suis* indujo inmunidad protectora inducida contra la estimulación homóloga. Por el contrario, la eficacia protectora de la vacuna de subunidad de MAP fue baja, aunque la inmunización con MAP dio lugar a títulos elevados en suero de IgG2 contra MRP y SAO. Es importante destacar que, la inmunización con bacterina, pero no con MAP, indujo títulos de

5 anticuerpos opsonizantes contra la cepa de serotipo 2, y se encontró que estos títulos de anticuerpos se correlacionaban con la protección. Sin embargo, después de la absorción con un mutante isogénico no encapsulado, los sueros de lechones inmunizados con bacterina no facilitaron la eliminación de neutrófilos, lo que indica que los anticuerpos dirigidos contra la cápsula pueden no haber sido esenciales para la opsonofagocitosis [Baums et al., 2009]. Además, la inducción de anticuerpos opsonizantes contra el serotipo 9 no era detectable en el grupo que recibió bacterina o en el grupo que recibió la vacuna de MAP, lo que da lugar a una baja protección contra cepas del serotipo 9.

10 **[0007]** Ninguno de los estudios de estimulación de vacunación han producido una vacuna ampliamente protectora contra infecciones por *S. suis*. Además, el conocimiento acerca de la comprensión precisa de la patogénesis de *S. suis* a nivel molecular es fragmentado debido al arsenal de factores de virulencia entre cepas dentro de un serotipo y el mecanismo molecular complejo involucrado en la interacción con su huésped. La falta de una vacuna eficaz contra las infecciones por *S. suis* es un problema importante en la producción porcina moderna. Por lo tanto, un objeto principal de la presente descripción para proporcionar una vacuna segura y eficaz de *S. suis*.

15 **[0008]** Fittipaldi et al. (2007) Vaccine, 25, 3524-35 describe el uso de una cepa mutante auxotrófica de *S. suis* (BD101) como vacuna.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

20 **[0009]** Un objetivo de la presente invención es proporcionar vacunas atenuadas. Dichas vacunas son para usar en procedimientos para el tratamiento y profilaxis de la infección por *S. suis*.

25 **[0010]** En un aspecto, la presente invención proporciona una cepa atenuada de *Streptococcus suis* (*S. suis*) capaz de proporcionar una respuesta inmunitaria segura y eficaz en animales porcinos contra *S. suis* o enfermedades causadas por *S. suis*, en la que la cepa tiene sustituciones de aminoácidos en genes de virulencia rpsL-S12 (una proteína de la subunidad ribosomal 30S), una proteína de membrana de unión a ATP transportadora ABC (ABC-ATPBMP), y un regulador de la transcripción marR con respecto a su cepa virulenta parental de *S. suis*, en la que dicha cepa parental comprende ácidos nucleicos que codifican proteínas de tipo natural que tienen secuencias de péptidos tal como se establecen en las SEQ ID NOs: 2, 6 y 10, y en la que la cepa atenuada tiene secuencias de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos tal como se establece en las SEQ ID NOs: 4, 8 y 12. En otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición inmunológica que comprende una cepa atenuada de *S. suis* de la presente invención. En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de la cepa atenuada de la presente invención en la fabricación de la composición inmunológica de la presente invención. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una cepa atenuada o una composición inmunológica de acuerdo con la presente invención para usar en terapia, en particular para usar en provocar una respuesta inmunitaria protectora en un animal porcino contra *S. suis* o enfermedades causadas por *S. suis*.

40 **[0011]** Por lo tanto, la presente invención se refiere además a nuevas cepas atenuadas de *S. suis*, que proporcionan una inmunidad protectora segura, eficaz y amplia. En relación a una cepa de *S. suis* parental, las cepas atenuadas de la presente descripción tienen nucleótidos polimórficos, cuya presencia está asociada con una virulencia reducida.

45 **[0012]** La bacteria mutante de la presente invención comprende ácidos nucleicos que se establecen en las SEQ ID NOs: 3, 7, y 11, que codifican los péptidos tal como se establecen en las SEQ ID NOs: 4, 8, y 12, y que provocan que la bacteria mutante sea atenuada/no virulenta, en relación con la bacteria virulenta de tipo natural/parental que comprende ácidos nucleicos que codifican proteínas que tienen secuencias de péptidos, tal como se establecen en las SEQ ID NOs: 2, 6, y 10. Las cepas de la presente descripción pueden tener "formas alternativas de genes", que se definen en el presente documento como "alelos", en relación con su cepa parental de *S. suis*. En una realización, los alelos alternativos son responsables de la virulencia reducida o atenuada. Tal como se define en el presente documento, el término "gen" se utilizará en un sentido amplio, y abarcará secuencias codificantes y no codificantes (es decir, secuencias reguladoras en dirección 5' y en dirección 3', promotores, 5'/3' UTR, intrones, y exones). Cuando se hace referencia a una secuencia codificante de un gen, el término "secuencia codificante de gen" o "CDS" se utilizan indistintamente en toda esta descripción.

55 **[0013]** Las cepas atenuadas de la presente descripción pueden tener uno o más polimorfismos en una rpsL-S12 (un proteína de unidad ribosomal 30S), una proteína de membrana de unión a ATP transportadora ABC (ABC-ATPBMP), y un regulador de la transcripción bacteriana (marR), los tres o combinaciones de los mismos. En una realización, hay al menos 4 diferencias de nucleótidos entre una cepa atenuada y su cepa parental: 2 SNP en la rpsL-S12 y 1 SNP en la ABC-ATPBMP y marR.

60 **[0014]** La presente invención se refiere a cepas de *S. suis* modificadas genéticamente, tal como se define por las reivindicaciones, en las que la expresión de rpsL-S12, ABC-ATPBMP, y marR se altera con respecto a la cepa parental de *S. suis*, dando lugar a una virulencia reducida de la cepa modificada genéticamente.

[0015] La presente descripción también se refiere a un procedimiento para producir una bacteria atenuada de *S. suis*, que comprende las etapas de:

- (a) cultivar una cepa parental de *S. suis* en presencia de un agente mutagénico;
- (b) sembrar células supervivientes en un medio apropiado;
- (c) analizar colonias individuales mediante la inyección en cerdos para determinar la virulencia;
- (d) determinar que la cepa está atenuada si los cerdos no presentan signos clínicos que están asociados con la infección por la cepa parental.

[0016] En una realización, las vacunas atenuadas comprenden además un adyuvante. El adyuvante puede ser cualquier sustancia que aumenta y/o incrementa la respuesta inmunitaria provocada, en comparación con la vacuna atenuada sola. Los adyuvantes de la mucosa, incluyendo quitosanos y derivados de los mismos, son particularmente útiles para las vacunas atenuadas orales descritas.

[0017] La presente invención facilita procedimientos para inducir una respuesta inmunológica (o inmunogénica) o protectora contra *S. suis*, así como procedimientos para prevenir o tratar *S. suis*, o un estado o estados patológicos causados por *S. suis*, que comprende administrar las bacterias atenuadas, o una composición que comprende las bacterias atenuadas, a los animales en necesidad de las mismas.

[0018] También se proporcionan kits que comprenden al menos la cepa atenuada de *S. suis* e instrucciones de uso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0019] Se describen en el presente documento secuencias de nucleótidos y genes implicados en la atenuación de un microorganismo, tales como bacterias, por ejemplo, bacterias Gram positivas, por ejemplo, *Streptococcus suis* (*S. suis*), los productos (por ejemplo, proteínas, antígenos, inmunógenos, epítopos) codificados por las secuencias de nucleótidos, los procedimientos para producir tales secuencias de nucleótidos, los productos, los microorganismos, y usos de los mismos, tales como para la preparación de composiciones de vacuna o inmunogénicas o para provocar una respuesta inmunológica o inmunitaria o como un vector, por ejemplo, como un vector de expresión (por ejemplo, un vector de expresión in vitro o in vivo).

[0020] Las mutaciones introducidas en las secuencias de nucleótidos y genes de microorganismos producen mutantes atenuados novedosos y no obvios. Estos mutantes son útiles para la producción de composiciones inmunogénicas atenuadas vivas o vacunas atenuadas vivas que tienen un alto grado de inmunogenicidad.

[0021] Estos mutantes también son útiles como vectores que pueden ser útiles para la expresión in vitro de productos de expresión, así como para la reproducción o replicación de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, la replicación del ADN), y para productos de expresión in vivo.

[0022] La identificación de las mutaciones proporciona secuencias de nucleótidos y genes nuevos y no obvios, así como productos génicos codificados por las secuencias de nucleótidos y genes novedosos y no obvios.

[0023] Dichos productos génicos proporcionan antígenos, inmunógenos y epítopos, y son útiles como productos génicos aislados.

[0024] Dichos productos génicos aislados, así como los epítopos de los mismos, también son útiles para generar anticuerpos, que son útiles en aplicaciones de diagnóstico.

[0025] Dichos productos génicos, que pueden proporcionar o generar epítopos, antígenos o inmunógenos, también son útiles para composiciones inmunogénicas o inmunológicas, así como vacunas.

[0026] En un aspecto, la descripción proporciona bacterias que contienen una mutación atenuante en una secuencia de nucleótidos o un gen en el que la mutación modifica, reduce o suprime la expresión y/o la actividad biológica de un polipéptido o proteína codificada por un gen, dando como resultado una virulencia atenuada de la bacteria.

[0027] La mutación no está necesariamente situada dentro de una secuencia o gen codificante para perturbar su función, que conduce a la atenuación. La mutación también se puede realizar en las secuencias de nucleótidos implicadas en la regulación de la expresión del gen, por ejemplo, en las regiones que regulan la iniciación de la transcripción, traducción y terminación de la transcripción. De este modo, también se incluyen promotores y regiones de unión al ribosoma (en general, estos elementos reguladores se encuentran aproximadamente entre 60 y 250 nucleótidos en dirección 5' del codón de inicio de la secuencia o gen codificante; Doree SM et al, J. Bacteriol 2001, 183 (6): 1983-9; Pandher K et al,

- Infect Imm 1998, 66 (12): 5613-9; Chung JY et al, FEMS Microbiol letters 1998, 166: 289-296), terminadores de la transcripción (en general, el terminador se encuentra dentro de aproximadamente 50 nucleótidos en dirección 3' del codón de parada de la secuencia o gen codificante; Ward, CK et al, Infect Imm 1998, 66 (7): 3326-36). En el caso de un operón, tales regiones reguladoras pueden estar situadas a una mayor distancia en dirección 5' del gen o secuencia codificante. Una mutación en una región intergénica puede conducir también a la atenuación.
- 5
- [0028] Una mutación dentro de tales secuencias reguladoras asociadas con la secuencia o gen codificante de manera que la mutación de esta secuencia de nucleótidos modifica, inhibe o suprime la expresión y/o la actividad biológica del polipéptido o la proteína codificada por el gen, dando lugar a una virulencia atenuada de la bacteria, sería un equivalente a una mutación dentro de un gen o secuencia codificante identificado en la presente invención
- 10
- [0029] La atenuación reduce o suprime la patogenicidad de las bacterias y la gravedad de los signos clínicos o lesiones, disminuye la tasa de crecimiento de las bacterias y evita la muerte de las bacterias.
- 15
- [0030] En particular, la presente invención abarca atenuada cepas de *S. suis* atenuadas de acuerdo con las reivindicaciones y vacunas que comprenden las mismas, que provocan una respuesta inmunogénica en un animal, particularmente las cepas de *S. suis* atenuadas que provocan, inducen o estimulan una respuesta en un animal porcino.
- 20
- [0031] Las cepas de *S. suis* atenuadas particulares de interés tienen mutaciones en genes, con relación a la cepa parental virulenta de tipo natural, que están asociados con la virulencia. Se reconoce que, además de cepas que tienen las mutaciones descritas, las cepas atenuadas que tengan cualquier número de mutaciones en los genes de virulencia descritos pueden ser utilizadas en la práctica de esta enseñanza. En una realización, las cepas atenuadas comprenden secuencias de ácido nucleico que comprenden los nucleótidos tal como se establecen en las SEQ ID NOs: 3, 7, 11, o combinaciones de las mismas. En el momento de esta descripción, estas secuencias no se sabía que existían en ningún genoma de *S. suis* de origen natural, y sólo se produjeron como resultado de los procedimientos de mutagénesis del inventor, que habían sido llevados a cabo en la cepa parental virulenta, en los que los genes de tipo natural comprendían los nucleótidos tal como se establecen en las SEQ ID NOs: 1, 5, y 9.
- 25
- [0032] Las cepas de *S. suis* atenuadas según la invención comprenden ácidos nucleicos que codifican péptidos que tienen las secuencias tal como se establecen en las SEQ ID NOs: 4, 8, 12. Las cepas comprenden ácidos nucleicos que codifican péptidos que tienen sustituciones de aminoácidos con respecto a las secuencias tal como se establecen en las SEQ ID NOs: 2, 6, 10, tal como se indica en la Tabla 1 (para la cepa de la vacuna).
- 30
- [0033] La cepa de *S. suis* atenuada tiene mutaciones, en relación con su cepa parental virulenta, como la cepa depositada en la ATCC con el Depósito de Patente de Designación PTA-13269. Estas mutaciones dan como resultado la cepa atenuada que tiene una virulencia reducida en relación con la cepa parental virulenta.
- 35
- [0034] En una realización particular, la cepa atenuada es la cepa depositada en la ATCC bajo el Depósito de Patente de Designación PTA-13269.
- 40
- [0035] En otro aspecto, las cepas atenuadas de *S. suis* novedosas se formulan en una vacuna segura, eficaz contra *S. suis* e infecciones/enfermedades causadas por *S. suis*.
- 45
- [0036] En una realización, las vacunas de *S. suis* comprenden además un adyuvante. En una realización particular, el adyuvante es un adyuvante de la mucosa, tal como quitosano, quitosano metilado, quitosano trimetilado, o derivados o combinaciones de los mismos.
- 50
- [0037] En una realización, el adyuvante comprende bacterias y/o virus completos, incluyendo *H. parasuis*, Clostridium, virus de la gripe porcina (SIV), circovirus porcino (PCV), virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), Mannheimia, Pasteurella, Histophilus, Salmonella, *Escherichia coli*, o combinaciones y/o variaciones de los mismos. En varias realizaciones, el adyuvante aumenta la producción del animal de IgM, EgG, IgA, y/o combinaciones de las mismas.
- 55
- [0038] Por "antígeno" o "inmunógeno" se entiende una sustancia que induce una respuesta inmunitaria específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o parte de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una parte o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmunitaria tras la presentación a un animal huésped; un polipéptido, un epítipo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina.
- 60
- [0039] Los términos "proteína", "péptido", "polipéptido" y "fragmento de polipéptido" se usan indistintamente en este documento para referirse a polímeros de residuos de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o

ramificado, puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos, y puede estar interrumpido por restos químicos distintos de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de forma natural o mediante intervención; por ejemplo la formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje o componente bioactivo.

[0040] El término "polipéptido inmunogénico o antigénico", como se usa en el presente documento incluye polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido de que una vez administrados al huésped, son capaces de evocar una respuesta inmunitaria de tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. Preferiblemente, el fragmento de proteína es tal que tiene sustancialmente la misma actividad inmunológica que la proteína total. Por lo tanto, un fragmento de proteína puede comprender o consistir esencialmente en o consistir en al secuencia de un epítipo o determinante antigénico. Una proteína o polipéptido "inmunogénico", tal como se usa en el presente documento, incluye la secuencia de longitud completa de la proteína, análogos de la misma, o fragmentos inmunogénicos de la misma. Por "fragmento inmunogénico" se entiende un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y de este modo provoca la respuesta inmunológica descrita anteriormente. Tales fragmentos pueden ser identificados usando cualquier cantidad de técnicas de mapeo de epítopos bien conocidas en el sector. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse mediante, por ejemplo, síntesis simultánea de grandes cantidades de péptidos sobre soportes sólidos, correspondencia de los péptidos a partes de la molécula de proteína, y reacción de los péptidos con anticuerpos, mientras los péptidos están todavía unidos a los soportes. Tales técnicas son conocidas en el sector y se describen en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos. No. 4.708.871; Geysen et al., 1984; Geysen et al., 1986. De manera similar, los epítopos conformacionales son fácilmente identificados mediante la determinación de la conformación espacial de aminoácidos, tales como mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols, supra. Los procedimientos especialmente aplicables a las proteínas de *T. parva* se describen completamente en el documento PCT/US2004/022605.

[0041] El término "polipéptido inmunogénico o antigénico" contempla además deleciones, adiciones y sustituciones en la secuencia, siempre que el polipéptido funcione para producir una respuesta inmunológica tal como se define en este documento. El término "variación conservativa" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico de tal manera que el residuo de aminoácido codificado no cambie o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente de naturaleza conservativa, es decir, aquellas sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos. Por ejemplo, los aminoácidos se dividen generalmente en cuatro familias: (1) ácidos - aspartato y glutamato; (2) básicos - lisina, arginina, histidina; (3) no polares - alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga - glicina, asparagina, glutamina, cistina, serina, treonina, tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces como aminoácidos aromáticos. Los ejemplos de variaciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro residuo hidrófobo, o la sustitución de un residuo polar por otro residuo polar, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, y similares; o una sustitución conservativa similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado que no tendrá un efecto importante sobre la actividad biológica. Las proteínas que tienen sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la molécula de referencia, pero que poseen sustituciones de aminoácidos menores que no afectan sustancialmente a la inmunogenicidad de la proteína están, por lo tanto, dentro de la definición del polipéptido de referencia. Todos los polipéptidos producidos por estas modificaciones se incluyen en el presente documento. El término "variación conservativa" también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental no sustituido, siempre que los anticuerpos producidos contra el polipéptido sustituido también inmunorreacten con el polipéptido no sustituido.

[0042] El término "epítipo" se refiere al sitio en un antígeno o hapteno al cual responden células B y/o células T específicas. El término también se usa indistintamente con "determinante antigénico" o "sitio determinante antigénico". Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo pueden identificarse en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana.

[0043] Una "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos a una composición o vacuna de interés. Por lo general, una "respuesta inmunológica" incluye, pero no se limita a uno o más de los siguientes efectos: la producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares, y/o células T citotóxicas, dirigidos específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en el composición o vacuna de interés. Preferentemente, el huésped mostrará una respuesta inmunológica terapéutica o protectora de manera que la resistencia a la nueva infección se verá reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad se verá reducida. Dicha protección se demostrará por una reducción o ausencia de síntomas y/o signos clínicos de la enfermedad normalmente mostrados por un huésped infectado, un tiempo de recuperación más rápido y/o un título viral disminuido en el huésped infectado.

[0044] Por "animal" se pretende mamíferos, aves, y similares. Animal o huésped tal como se usa en el presente documento incluye mamíferos y humanos. El animal puede ser seleccionado del grupo que consiste en equino (por ejemplo, caballos), caninos (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felino (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros gatos grandes, y otros felinos incluyendo guepardos y lince), ovino (por ejemplo, ovejas), bovino (por ejemplo, ganado vacuno), porcino (por ejemplo, cerdo), aves (por ejemplo, pollo, pato, ganso, pavo, codorniz, faisán, loro, pinzones, halcón, cuervo, avestruz, emu y casuario), primates (por ejemplo, prosimios, tarsero, mono, gibón, simio), hurones, focas, y pescado. El término "animal" también incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluyendo recién nacido, embrionario y etapas fetales.

Composiciones

[0045] La presente invención se refiere a una vacuna o composición de *S. suis* que comprende una cepa de *S. suis* atenuada de acuerdo con la invención y un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable, que provoca, induce o estimula una respuesta en una animal.

[0046] El término "ácido nucleico" y "polinucleótido" se refiere a ARN o ADN que es lineal o ramificado, monocatenario o bicatenario, o un híbrido de los mismos. El término también abarca híbridos de ARN/ADN. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: un gen o fragmento de gen, exones, intrones, ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, uracilo, otros azúcares y grupos de unión, tales como fluororibosa y tiolato, y ramas de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos se puede modificar adicionalmente después de la polimerización, tal como mediante conjugación, con un componente de marcaje. Otros tipos de modificaciones incluidas en esta definición son los bloqueos terminales, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, y la introducción de medios para unir el polinucleótido a proteínas, iones metálicos, componentes de marcaje, otros polinucleótidos o soporte sólido. Los polinucleótidos se pueden obtener mediante síntesis química o derivarse de un microorganismo.

[0047] El término "gen" se utiliza ampliamente para referirse a cualquier segmento de polinucleótido asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen intrones y exones como en la secuencia genómica, o sólo las secuencias codificantes como en ADNc y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. Por ejemplo, el gen también se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional, o codifica una proteína específica, y que incluye secuencias reguladoras.

[0048] Un componente biológico "aislado" (tal como un ácido nucleico o proteína u orgánulo) se refiere a un componente que se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que se produce el componente de forma natural, por ejemplo, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y proteínas que han sido "aislados" incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos de purificación estándar. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados por tecnología recombinante, así como mediante síntesis química.

[0049] El término "variación conservativa" indica el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro residuo biológicamente similar, o la sustitución de un nucleótido en una secuencia de ácido nucleico, de manera que el residuo de aminoácido codificado no cambia o es otro residuo biológicamente similar. A este respecto, las sustituciones particularmente preferidas serán generalmente conservativas en la naturaleza, tal como se describe anteriormente.

[0050] El término "recombinante" significa un polinucleótido de origen semisintético o sintético que, o bien no se produce en la naturaleza o está ligado a otro polinucleótido en una disposición no encontrada en la naturaleza.

[0051] "Heterólogo" significa derivado de una entidad genéticamente distinta del resto de la entidad a la que se está comparando. Por ejemplo, un polinucleótido puede colocarse mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una fuente diferente, y es un polinucleótido heterólogo. Un promotor eliminado de su secuencia codificante nativa y unido operativamente a una secuencia codificante distinta de la secuencia nativa es un promotor heterólogo.

[0069] Los polinucleótidos pueden comprender secuencias adicionales, tales como secuencias codificantes adicionales dentro de la misma unidad de transcripción, elementos de control, tales como promotores, sitios de unión a ribosomas, 5'UTR, 3'UTR, terminadores de transcripción, sitios de poliadenilación, unidades de transcripción adicionales bajo el control del mismo o un promotor diferente, secuencias que permiten la clonación, expresión, recombinación homóloga y

transformación de una célula huésped, y cualquier constructo tal como pueden ser deseable para proporcionar realizaciones de esta invención.

Procedimientos de uso y artículo de fabricación

5

[0053] La presente invención facilita las siguientes realizaciones de procedimiento. Por ejemplo, se describen un procedimiento de vacunación de un animal que comprende administrar una composición que comprende una cepa de *S. suis* atenuada y un portador, excipiente o vehículo farmacéutica o veterinariamente a un animal. En un aspecto, el animal es un animal porcino.

10

[0054] En una realización de la invención, se puede emplear un régimen de sensibilización-refuerzo, que se compone de al menos una administración primaria y al menos una administración de refuerzo usando al menos un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno común. Típicamente, la composición inmunológica o vacuna utilizada en la administración primaria es de naturaleza diferente de las utilizadas como refuerzo. Sin embargo, se observa que la misma composición se puede utilizar como administración primaria y administración de refuerzo. Este protocolo de administración se llama "sensibilización-refuerzo".

15

[0055] Un régimen de sensibilización-refuerzo comprende al menos una sensibilización-administración y al menos una administración de refuerzo usando al menos un polipéptido común y/o variantes o fragmentos del mismo. La vacuna utilizada en la sensibilización-administración puede ser de naturaleza diferente a las utilizadas como una vacuna de refuerzo posterior. La sensibilización-administración puede comprender una o más administraciones. Del mismo modo, la administración de refuerzo puede comprender una o más administraciones.

20

[0056] El volumen de dosis de composiciones de las especies objetivo que son mamíferos, por ejemplo, el volumen de dosis de composiciones de cerdos o cochinos, basado en antígenos bacterianos, es generalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,0 ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 ml, y de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 1,0 ml.

25

[0057] La eficacia de las vacunas puede probarse aproximadamente de 2 a 4 semanas después de la última inmunización mediante la estimulación de los animales, tales como porcinos, con una cepa virulenta de *S. suis*. Ambas cepas homólogas y heterólogas se utilizan para la estimulación para probar la eficacia de la vacuna. El animal puede estimularse mediante inyección IM o SC, aerosol, por vía intranasal, intraocular, intratraqueal, y/o por vía oral. Las muestras de las articulaciones, los pulmones, el cerebro y/o la boca pueden ser recogidas antes y después de la estimulación y pueden ser analizadas para la presencia de anticuerpo específico de *S. suis*.

30

[0058] Las composiciones que comprenden las cepas bacterianas atenuadas de la invención utilizadas en los protocolos de sensibilización-refuerzo están contenidas en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable. Los protocolos de la invención protegen al animal de *S. suis* y/o previenen la progresión de la enfermedad en un animal infectado.

35

[0059] Las diversas administraciones se realizan preferiblemente con de 1 a 6 semanas de diferencia. El intervalo de tiempo preferido es de 3 a 5 semanas, y óptimamente 4 semanas de acuerdo con una realización, también se prevé un refuerzo anual. Los animales, por ejemplo, cerdos, pueden tener al menos 3-4 semanas de edad en el momento de la primera administración.

40

[0060] Se debe entender por un experto en la técnica que la presente descripción se proporciona a modo de ejemplo y la presente invención no se limita a la misma. A partir de la descripción de este documento y el conocimiento en la técnica, un experto en la materia puede determinar el número de administraciones, la vía de administración, y las dosis a utilizar para cada protocolo de inyección, sin una gran experimentación.

45

[0061] La presente invención también facilita un kit para realizar un procedimiento de provocar o inducir una respuesta inmunológica o de protección contra *S. suis* en un animal que comprende una composición o vacuna inmunológica de *S. suis* atenuada y las instrucciones para realizar el procedimiento de liberación en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el animal. El kit puede ser para realizar un procedimiento de inducir una respuesta inmunológica o protectora contra *S. suis* en un animal que comprende una composición o vacuna que comprende una cepa de *S. suis* atenuada de la invención, e instrucciones para realizar el procedimiento de liberación en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmunitaria en el animal.

50

[0062] El kit puede ser para la vacunación de sensibilización-refuerzo de acuerdo con la presente invención tal como se describe anteriormente. El kit puede comprender al menos dos viales: un primer vial que contiene una vacuna o composición para la vacunación de sensibilización de acuerdo con la presente invención, y un segundo vial que contiene

55

60

una vacuna o composición para la vacunación de refuerzo según la presente invención. El kit puede contener ventajosamente primeros o segundos viales adicionales para vacunas de refuerzo adicionales o vacunas de refuerzo adicionales.

5 [0063] Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un portador o vehículo o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable puede ser una solución de NaCl al 0,9% (por ejemplo, solución salina) o un tampón fosfato. Otros portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables que se pueden utilizar para los procedimientos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, poli-(L-glutamato) o polivinilpirrolidona. Los portadores o vehículos o excipientes farmacéutica o veterinariamente aceptables pueden ser cualquier compuesto o combinación de compuestos que facilitan la administración del vector (o proteína expresada a partir de un vector de la invención in vitro); ventajosamente, el portador, vehículo o excipiente puede facilitar la transfección y/o mejorar la conservación del vector (o proteína). Las dosis y los volúmenes de dosis en el presente documento se describen en la descripción general y también pueden ser determinados por el experto en la materia a partir de esta descripción leída en relación con el conocimiento en la técnica, sin una gran experimentación.

10 [0064] Las composiciones y vacunas inmunológicas de acuerdo con la invención puede comprender uno o más adyuvantes. Los adyuvantes adecuados para usar en la práctica de la presente invención son (1) polímeros de ácido acrílico o metacrílico, anhídrido maleico y polímeros de derivados de alqueno, (2) secuencias inmunoestimulantes (ISS), tales como secuencias de oligodesoxirribonucleótidos que tienen una o más unidades CpG no metiladas (Klinman et al, 1996; WO98/16247), (3) una emulsión de aceite en agua, tal como la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach", publicado por M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 de la misma obra, (4) lípidos catiónicos que contienen una sal de amonio cuaternario, por ejemplo, DDA (5) citoquinas, (6) hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, (7) saponina o (8) otros adyuvantes descritos en cualquier documento citado e incorporado por referencia en la presente solicitud, o (9) cualquier combinación o mezclas de los mismos.

20 [0065] En una realización, los adyuvantes incluyen aquellos que promueven una mejor absorción a través de revestimientos de la mucosa. Algunos ejemplos incluyen MPL, LTK63, toxinas, micropartículas de PLG y varios otros (Vajdy, M. Immunology and Cell Biology (2004) 82, 617-627). En una realización, el adyuvante puede ser un quitosano (Van der Lubben et al 2001; Patel et al 2005; Majithiya et al 2008; patente de Estados Unidos No. de serie 5,980.912).

25 [0066] En una realización, el adyuvante puede ser bacterias inactivadas, un virus inactivado, fracciones de bacterias inactivadas, lipopolisacáridos bacterianos, toxinas bacterianas o derivados o combinaciones de los mismos.

30 [0067] En una realización, el adyuvante comprende bacterias y/o virus completos, incluyendo *H. parasuis*, Clostridium, virus de la inmunodeficiencia porcina (SIV), circovirus porcino (PCV), virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), Mannheimia, Pasteurella, Histophilus, Salmonella, *Escherichia coli*, o combinaciones y/o variaciones de los mismos. En varias realizaciones, el adyuvante aumenta la producción del animal de IgM, EgG, IgA, y/o combinaciones de las mismas.

Referencias:

- 35 [0068]
- 45 1. Allgaier, A., et al. 2001. Relatedness of Streptococcus suis isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. J. Clin. Microbiol. 39, 445-453.
 2. Baums, C. G., et al., 2006. Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in Streptococcus suis. Infect. Immun. 74, 6154-6162.
 3. Baums, C.G., et al., 2009. Streptococcus suis bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. Clin Vaccine Immunol. 2, 200-208.
 4. Berthelot-Herault, F., et al., 2005. Dilemma of virulence of Streptococcus suis: Canadian isolate 89- 1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. Can. J. Vet. Res. 69, 236-240.
 5. Chabot-Roy, G. et al., 2006. Phagocytosis and killing of Streptococcus suis by porcine neutrophils. Microb. Pathog. 41, 21-32.
 - 55 6. Davidson A.L., et al., 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems". Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72, 317-364.
 7. Davidson A.L., Chen J., 2004. ATP-binding cassette transporters in bacteria". Annu. Rev. Biochem 73, 241-268.
 8. de Greeff, A., et al., 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of Streptococcus suis serotype 2. Infect. Immun. 70, 1319-1325.
 - 60 9. Fittipaldi, N. et al., 2008a. Significant contribution of the pgdA gene to the virulence of Streptococcus suis. Mol. Microbiol. 78, 1120-1135.

10. Fittipaldi, N. et al., 2008b. D-Alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. *Infect. Immun.* 76, 3587-3594.
11. Fittipaldi, N. et al., 2011. Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from North America. *Emerg Infect Dis.* 12, 2239-2244.
- 5 12. Gottschalk, M. et al., 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. *Anim. Health Res. Rev.* 8, 29-45.
13. Henderson D.P., Payne, S.M., 1994. *Vibrio cholerae* iron transport system: roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems". *Infect. Immun* 62, 5120-5125.
- 10 14. Higgins, R., Gottschalk, M., 2006. Streptococcal diseases. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, pp. 769-783.
15. Jacobs, A., et al., 1996. Protection of experimentally infected pigs by suliyisin, the thiol-activated hemolysin of *Streptococcus suis*. *Vet. Rec.* 139, 225-228.
16. Li, Y., et al., 2007. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against streptococcus suis infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 937-943.
- 15 17. McEvoy, G.K., editor. 1989. *AHFS Drug information* 89. Bethesda, MD: American Society of Hospital Pharmacists, 1925-1927.
18. Perch, B., et al., 1968. Group R streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. *Acta Pathol Microbiol Scand* 74, 69-76.
19. Poole, R.K., et al., 1994. The *cydD* gene product, component of a heterodimeric ABC transporter, is required for assembly of periplasmic cytochrome-c and of cytochrome-bd in *Escherichia coli*". *FEMS Microbiol. Lett.* 117, 217-224.
- 20 20. Poolman, B., et al., 2004. Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions". *Biochim. Biophys. Acta* 1666, 88-104.
21. Quessy, S., et al., 1995. Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins. *Infect. Immun.* 63, 1975-1979.
- 25 22. Smith, H.E., et al., 1999. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect. Immun.* 67, 1750-1756.
23. Sinha, R.P., 1977. Acriflavine-Resistant Mutant of *Streptococcus cremoris*. *Antimicro and Chemo* 12, 383-389.
24. Vecht, U. et al., 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. *Infect. Immun.* 59, 3156-3162.
- 30 25. Vecht, U. et al., 1992. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. *Infect. Immun.* 60, 550-556.
26. Wisselink, H. J., et al., 2002. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a nonencapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. *Vet. Microbiol.* 84, 155-168.
27. Zhou, Z.M., et al., 1998. Function of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis". *J. Biol. Chem.* 273, 12466-12475.
- 35 28. George, A. M., and S. B. Levy. 1983. Gene in the major cotransduction gap of the *Escherichia coli* K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. *J. Bacteriol.* 155:541-548.

40 **[0069]** La invención se describirá a continuación adicionalmente a modo de los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Producción y análisis genómico de *S. suis* atenuada

45 **[0070]** Con el fin de desarrollar una vacuna ampliamente protectora contra infecciones por *S. suis*, se aisló una cepa de campo de Estados Unidos (cepa parental, Newport Laboratorios no 8-1433-1, SEQ ID NO: 9.) de un hisopo de cerebro porcino. El aislado se identificó como serotipo 2 de *S. suis*, basándose en reacciones bioquímicas y ensayos de aglutinación. La atenuación de esta cepa parental se realizó por mutagénesis química usando clorhidrato de acriflavina, tal como se describe por Sinha et al. Brevemente, se cultivaron células parentales de *S. suis* durante 18 horas en caldo

50 de tripticasa de soja que contenía sangre de oveja al 5% suplementado con 10 µM/ml de clorhidrato de acriflavina. Las células supervivientes se reaislaron en placas de agar con sangre de oveja. Se seleccionaron veinte colonias individuales y se cultivaron por separado en el mismo medio líquido. Se seleccionó un cultivo de 20 y se inyectó (1,76 x 10⁹ células/ml) en cerdos para determinar la virulencia. Se inocularon diez cerdos, por vía oral, y se observaron durante 26 días. No se observaron signos clínicos compatibles con la infección por *S. suis* en este período de tiempo. Además de ser altamente

55 atenuada, la cepa mutante era resistente a la neomicina. Además, el genoma completo de la cepa de vacuna mutante/candidata (SEQ ID NO: 10), así como la cepa parental (SEQ ID NO: 9), se secuenció completamente y se analizaron para los polimorfismos de nucleótido único (SNP) que pueden conferir el fenotipo no virulento.

60 **[0071]** *Secuenciación.* Para secuenciar los genomas de las cepas parentales y mutantes, se granularon los cultivos en fase logarítmica de *S. suis* y el ADN se purificó utilizando el mini kit Qiagen DNA (Qiagen, Valencia, CA). A continuación, se produjo una biblioteca de ADN genómico (Illumina Genomic DNA Prep Kit, Illumina, San Diego, CA), y se sometió a

amplificación por grupos en una Single End Flow Cell v4 con un instrumento Cluster Generation Station (Illumina) para generar una intensidad de grupo sin procesar de ~ 600.000 mm². La secuenciación se realizó en un Analizador de Genoma GAI durante 56 ciclos usando reactivos de kit de secuenciación (Illumina). Las secuencias se compararon a continuación contra la secuencia del genoma GenBank descrita de *S. suis*, P1/7 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AM946016.1>) (SEQ ID NO: 11), y la homología se identificó con genes definidos conocidos. Las secuencias de las cepas parentales y mutantes se compararon para buscar polimorfismos de nucleótido único (SNP) que se produjeron en las regiones codificantes de los genes (a pesar de que se reconoce y se prevé por los inventores, las regiones no codificantes también pueden ser responsables de los fenotipos atenuados/no virulentos). Este análisis reveló varios SNP y los que dieron lugar a cambios de aminoácidos (no sinónimos) se sometieron a una verificación adicional. Los SNP que dieron lugar al cambio de aminoácidos se verificaron utilizando la técnica de secuenciación de Sanger de acuerdo con protocolos establecidos.

[0072] Las lecturas se filtraron por la calidad usando un script de Python personalizado. Las bases de baja calidad fueron recortadas primero de los extremos de las lecturas, tras lo cual se mantuvieron solamente si había al menos 40 pb con la calidad > 20 y no ambiguamente llamadas bases internas. Tras el recorte y etapa de filtrado, las lecturas se mapearon contra un conjunto de genomas de referencia utilizando el alineador Burrows-Wheeler (BWA) versión 0.6.1-r104 (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). La salida de Sequence Alignment/Map (SAM) de BWA se analizó adicionalmente utilizando el paquete SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) con el fin de llamar a variantes. Las llamadas variantes resultantes se analizaron adicionalmente usando un script personalizado escrito en R en el que las variantes se anotaron en función de su posición dentro del genoma. Las variantes también se filtraron basándose en la profundidad de cobertura, la calidad de genotipo descrito por SAMtools, y para variantes que fueron segregándose con respecto a las muestras de parental y mutante. SAMtools también se usó para generar una secuencia consenso basándose en los resultados del mapeo. Esta secuencia se anotó en base a la secuencia de referencia y se formateó como un archivo de GenBank para la compatibilidad de Artemis utilizando scripts personalizados y BioPython (<http://biopython.org/wiki/BioPython>). La comparación de los genomas parental vs. mutante (vacuna) dio lugar a 3 SNP que atraviesan dos genes; 1) Dos SNP en una proteína de subunidad ribosomal 30S rpsL-S12 y 2) un SNP en proteína de membrana de unión a ATP transportadora ABC. Estos tres SNP fueron confirmados mediante procedimientos de secuenciación estándar de Sanger.

[0073] Significancia funcional de una proteína de la subunidad ribosomal 30S rpsL-S12: Las proteínas pequeñas de subunidad 30S (S) y proteínas grandes de subunidad 50S (L) son componentes críticos de la maquinaria de síntesis de proteínas. Estas proteínas de la subunidad funcionan como sitios de unión para muchos antibióticos y las mutaciones en cualquiera/más de estas proteínas de subunidades dan lugar a resistencia o susceptibilidad a antibióticos. Las mutaciones causadas por polimorfismos de nucleótido único (SNP) en la subunidad más pequeña confieren resistencia a los antibióticos, tales como tetraciclina, espectinomina, higromicina B y estreptomina, mientras que las mutaciones en la subunidad más grande confieren resistencia contra cloranfenicol, eritromicina, y estreptogramina B. La cepa de vacuna de *S. suis* es resistente a la neomicina (16 µg/ml) como resultado de estos dos SNP en la proteína pequeña de subunidad ribosomal (S12) y tiene un fenotipo no virulento. En las bacterias de tipo natural, la neomicina se transporta activamente a través de la membrana celular bacteriana, se une a una proteína receptora específica en la subunidad 30S de ribosomas bacterianos e interfiere con un complejo de iniciación entre ARNm (ARN mensajero) y la subunidad 30S, inhibiendo la síntesis de proteínas. El ADN puede leerse incorrectamente, produciendo así proteínas no funcionales; los polirribosomas se separan y son incapaces de sintetizar la proteína [McEvoy, 1989].

[0074] Significancia funcional de la proteína de membrana de unión a ATP transportadora ABC: Los transportadores de casete de unión a ATP bacterianos (transportadores de ABC) son esenciales para la supervivencia celular y para el transporte de virulencia o factores asociados a virulencia [Davidson et al., 2008; Henderson et al., 1994]. Los transportadores de ABC son extremadamente vitales en la supervivencia celular y funcionan como osmoprotectores al mediar en la captación de solutos y prevenir el aumento letal en la fuerza osmótica [Poolman et al., 2004]. Además, las proteínas ABC bacterianas también están involucradas en la regulación de varios procesos fisiológicos. Los transportadores de ABC también sirven en sistemas de flujo bacterianos mediante la extrusión de componentes a la superficie celular (por ejemplo polisacáridos capsulares, lipopolisacáridos, y ácido teicoico), proteínas implicadas en la patogénesis bacteriana (por ejemplo, hemólisis, proteína de unión a hemo y proteasa alcalina), hemo, enzimas hidrolíticas, proteínas de la capa S, factores de competencia, toxinas, antibióticos, bacteriocinas, antibióticos peptídicos, fármacos y sideróforos [Davidson et al., 2008; Davidson y Chen, 2004]. También juegan un papel importante en rutas biosintéticas, incluyendo la biosíntesis de polisacárido extracelular y la biogénesis de citocromo [Zhou et al., 1998; Poole et al., 1994].

[0075] Significancia funcional de regulador de la transcripción marR. El análisis del dominio conservado de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?WWP257HN01N&mode=all>) indica que este gen codifica un regulador transcripcional que contiene un motivo "hélice-giro-hélice" implicado en la resistencia a múltiples antibióticos (HTH_MARR), parte del operón *marRAB*. En *Escherichia coli*, *marA* codifica un regulador positivo de la respuesta de resistencia a antibióticos, mientras que *marR* codifica un represor de la transcripción de *marRAB* y controla la producción de MarA en respuesta a señales ambientales (George y Levy, 1983). El SNP en la cepa de la vacuna descrita se encuentra dentro del dominio HTH_MARR (posiciones de aminoácidos 30 a 125). El dominio hélice-giro-hélice se une al ADN y es la

característica singular de los reguladores de la transcripción. La proteína MarR de tipo natural es un dímero conteniendo cada subunidad un motivo de unión a ADN "hélix-winged" involucrado en la regulación de la transcripción.

- 5 [0076] En conjunto, las mutaciones en estos tres genes (SNP resumidos en la Tabla 1) hacen la cepa de la vacuna de NPL de *S. suis* avirulenta y resistente a neomicina, y posiblemente a otros antibióticos.

Tabla 1. Localización de SNP e identificación de genes mutados en la cepa atenuada de *S. suis*

Gen	SNP#	Posición de nucleótido	Cepa parental	Cepa de vacuna	Cambio de aminoácido
rpsL-S 12	1	167	A (se encuentra en SEQ ID NO: 1)	C (se encuentra en SEQ ID NO: 3)	Lisina a treonina (K-T)
rpsL-S 12	2	301	A (se encuentra en SEQ ID NO: 1)	C (se encuentra en SEQ ID NO: 3)	Lisina a glutamina (K-Q)
bmp a ATP transportadora ABC	3	323	G (se encuentra en SEQ ID NO: 5)	A (se encuentra en SEQ ID NO: 7)	Arginina a histidina (R-H)
marR	4	265	C	T	Arginina a
Regulador de la transcripción			(se encuentra en SEQ ID NO: 9)	(se encuentra en SEQ ID NO: 11)	Cisteína (R-C)

10 **Ejemplo 2 - Eficacia de vacunas de *S. suis* atenuadas en animales porcinos**

[0077] *Protocolo general para estudios de eficacia:* Se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de cada dilución de vacuna mediante titulación antes y después de la vacunación.

- 15 [0078] Todos los cerdos utilizados en estos estudios se obtuvieron de Midwest Research Swine, Gibbon, MN, y estaban sanos y normales en el momento de la entrega. La piara se considera una piara de origen de buena salud, que no tenía un historial de infección por *Streptococcus suis* y era negativa para el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS). Los lechones de la piara de origen tenían un historial susceptible a una estimulación con *S. suis* en los estudios anteriores. Los cerdos recibieron a los 17-24 días de vida. Se observaron antes de la vacunación los animales y se consideraron clínicamente normales ya que carecían de signos de enfermedad, incluyendo tos, respiración abdominal, y/o cojera. El cerdo individual se utilizó como unidad experimental en estos estudios y se etiquetó en la oreja antes de la entrega. Los animales fueron asignados aleatoriamente a los espacios habilitados y a los grupos de tratamiento utilizando el generador de números aleatorios en Microsoft Excel.

- 25 [0079] *Programación de eventos.* Todos los cerdos se vacunaron en el día 0. Cada cerdo en los grupos de vacuna recibieron 1 ml de vacuna apropiada, por vía oral. A los animales de control se les administró 1 ml de solución salina estéril, por vía oral, que sirvieron como placebo. Aproximadamente 30-35 días después de la vacunación, todos los cerdos se estimularon y se observaron durante once días después de la estimulación.

- 30 [0080] *Estimulación.* El aislado de estimulación era de una muestra de hisopo de cerebro (aislado 8-1433-1). Se identificó como un aislado de *Streptococcus suis* de tipo 2 a través de la aparición de colonias en placas de agar sangre (colonias blancas, lisas, redondas, pequeñas), reacción de tinción Grams, pruebas bioquímicas (alfa-hemolítica, catalasa negativa, no hay crecimiento en caldo con cloruro de sodio al 6,5% y esculina positiva). El aislado se cultivó hasta aproximadamente 9 logs/ ml en un medio de cultivo líquido, se congeló en alícuotas de 1 ml en ampollas estériles con la etiqueta "8-1433-1", y se almacenaron a -80°C. Estudios anteriores demostraron virulencia de este aislado en cerdos.

- 35 [0081] Aproximadamente 4 horas antes de la estimulación, se descongeló una ampolla del aislado de campo de *Streptococcus suis* de tipo 2 virulento (aislado 8-1433-1). La ampolla se utilizó para inocular medio fresco y este cultivo se incubó en un agitador orbital a 37°C hasta que se alcanzó una densidad óptica de aproximadamente 1,0 a 600 nanómetros (nm) en un espectrofotómetro. El cultivo era teñido Gram; colonias características de los pequeños cocos en cadenas y estaban presente células individuales y puras. El recuento viable del inóculo de la estimulación se determinó inmediatamente antes e inmediatamente después de la estimulación. Cada cerdo recibió 2 ml del inóculo de estimulación por vía intramuscular.

- 40 [0082] *Observaciones.* Se observaron cerdos diariamente por individuos que fueron cegados a la asignación del tratamiento. Se registraron los animales que presentaron cojera, renuncia a levantarse, trastornos del sistema nervioso central (SNC) o muerte. "*S. suis* DMO" es la cepa atenuada que comprende los SNP indicados en la Tabla 1, que fue depositada de acuerdo con el Tratado de Budapest bajo depósito de patente ATCC de designación PTA-13269.

Tabla 2. Ruta oral Vx/Estudio de estimulación 1

Grupo de tratamiento	Porcentaje de enfermos	Porcentaje de muertos	Porcentaje de protección
6 logs, DMO	50%	30%	70%
7 logs, DMO	30%	10%	90%
8 logs, DMO	44%	11%	89%
Controles	90%	40%	60%

5

Tabla 3. Ruta oral Vx/Estudio de estimulación 1

Grupo de tratamiento	Porcentaje de enfermos	Porcentaje de muertos	Porcentaje de protección
S. suis, DMO	40%	30%	70%
Controles	80%	40%	60%

Tabla 4. Ruta oral Vx/Estudio de estimulación 2

Grupo de tratamiento	Porcentaje de enfermos	Porcentaje de muertos	Porcentaje de protección
6 logs, DMO	15%	10%	90%
7 logs, DMO	10,5%	5,2%	94,8%
8 logs, DMO	10,5%	10,5%	89,5%
Controles	60%	33,3%	66,7%

10

Tabla 5. Estudio de eficacia 1

Grupo	# muertos	% muertos	# enfermos	% muertos
6 logs, DMO	6/20	30%	9/20	45%
7 logs, DMO	0/20	0%	4/20	20%
8 logs, DMO	3/20	15%	6/20	30%
Controles	6/20	30%	11/20	55%

15

Tabla 6. Estudio de eficacia 2

Grupo	# muertos	% muertos	# enfermos	% muertos
6 logs, DMO	8/20	40%	12/20	60,0%
7 logs, DMO	4/19	21,1%	11/19	58,0%
8 logs, DMO	5/20	25,0%	5/20	25,0%
Controles	10/19	52,6%	16/19	84,0%

LISTADO DE SECUENCIAS

[0083]

20

<110> Merial Limited
 Bey, Russell
 Lawrence, Paulraj
 Simonson, Randy
 25 Sirigireddy, Kamesh
 Mckeown, Danielle

30

<120> vacunas atenuadas contra Streptococcus suis y procedimientos de fabricación y uso de las mismas

35

<130> MER 12-197
 <150> USSN 61/664,935
 <151> 2012-06-27
 <160> 12

```

<170> PatentIn version 3.5

5 <210> 1
  <211> 411
  <212> ADN
  <213> Streptococcus suis

10 <400> 1
    atgcctacaa ttaaccagtt ggtacgtaaa ccacgtaagt ctaaagtaga aaaatctaaa      60
    tcaccagctt tgaacgttgg ttacaacagc cgtaaaaaag ttcaaacaaa cgtttcatca      120
15  ccacaaaaac gcggtgttgc aactcgtgtc ggaacaatga cacctaaaaa acctaactca      180
    gcccttcgta aatttgctcg tgtacgtttg agcaacctta tcgaagttac tgcttacatc      240
    ccaggatcgc gtcacaactt gcaagaacac agtgtggttc ttcttcgtgg tggacgtgta      300
20  aaagaccttc caggggtacg ttaccatatac gttcgtggtg cacttgatac tgctggtgta      360
    aacgatccta agcaaggccg ttctaaatac ggtactaaac gtccaaaagg c              411

25 <210> 2
  <211> 137
  <212> PRT
  <213> Streptococcus suis

30 <400> 2
    Met Pro Thr Ile Asn Gln Leu Val Arg Lys Pro Arg Lys Ser Lys Val
    1          5          10          15

35  Glu Lys Ser Lys Ser Pro Ala Leu Asn Val Gly Tyr Asn Ser Arg Lys
    20          25          30

40  Lys Val Gln Thr Asn Val Ser Ser Pro Gln Lys Arg Gly Val Ala Thr
    35          40          45

45  Arg Val Gly Thr Met Thr Pro Lys Lys Pro Asn Ser Ala Leu Arg Lys
    50          55          60

50  Phe Ala Arg Val Arg Leu Ser Asn Leu Ile Glu Val Thr Ala Tyr Ile
    65          70          75          80

55  Pro Gly Ile Gly His Asn Leu Gln Glu His Ser Val Val Leu Leu Arg
    85          90          95

60  Gly Gly Arg Val Lys Asp Leu Pro Gly Val Arg Tyr His Ile Val Arg
    100         105         110

60  Gly Ala Leu Asp Thr Ala Gly Val Asn Asp Arg Lys Gln Gly Arg Ser
    115         120         125

```

ES 2 662 801 T3

Lys Tyr Gly Thr Lys Arg Pro Lys Gly
 130 135

5 <210> 3
 <211> 411
 <212> ADN
 <213> Streptococcus suis

10 <400> 3
 atgcctacaa ttaaccagtt ggtacgtaaa ccacgtaagt ctaaagtaga aaaatctaaa 60
 tcaccagctt tgaacgttgg ttacaacagc cgtaaaaaag ttcaaacaaa cgtttcatca 120
 15 ccacaaaaac gcggtggttc aactcgtgtc ggaacaatga cacctacaaa acctaactca 180
 gcccttcgta aatttgctcg tgtacgtttg agcaacctta tcgaagttac tgcttacatc 240
 20 ccaggatcgc gtcacaactt gcaagaacac agtgtggttc ttcttcgtgg tggacgtgta 300
 caagaccttc caggggtacg ttaccatata gttcgtggtg cacttgatac tgctggtgta 360
 aacgatccta agcaaggccg ttctaaatac ggtactaac gtccaaaagg c 411

25 <210> 4
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Streptococcus suis

30 <400> 4

Met Pro Thr Ile Asn Gln Leu Val Arg Lys Pro Arg Lys Ser Lys Val
 1 5 10 15

35 Glu Lys Ser Lys Ser Pro Ala Leu Asn Val Gly Tyr Asn Ser Arg Lys
 20 25 30

40 Lys Val Gln Thr Asn Val Ser Ser Pro Gln Lys Arg Gly Val Ala Thr
 35 40 45

45 Arg Val Gly Thr Met Thr Pro Thr Lys Pro Asn Ser Ala Leu Arg Lys
 50 55 60

50 Phe Ala Arg Val Arg Leu Ser Asn Leu Ile Glu Val Thr Ala Tyr Ile
 65 70 75 80

55 Pro Gly Ile Gly His Asn Leu Gln Glu His Ser Val Val Leu Leu Arg
 85 90 95

Gly Gly Arg Val Gln Asp Leu Pro Gly Val Arg Tyr His Ile Val Arg
 100 105 110

60 Gly Ala Leu Asp Thr Ala Gly Val Asn Asp Arg Lys Gln Gly Arg Ser
 115 120 125

ES 2 662 801 T3

Lys Tyr Gly Thr Lys Arg Pro Lys Gly
 130 135

5
 <210> 5
 <211> 1782
 <212> ADN
 <213> Streptococcus suis

10
 <400> 5

atgaagacgt tacgtttttt ctggttttat tttaaacgct ataaactgtc ctttgctgtg 60
 atttttctag ccattgtggc agcgacctac ctgcaggtta agacacctgt tttccttgga 120
 15
 aatgccattg cggagatggg gaaaatcggg caggcttact ttatggccaa tcaagctggg 180
 caggctgact ttcagccaga catggctgat tttaacgggg ttatgctcaa tcttttcttt 240
 20
 gcctatgcgg cgacggttgt ggcttccttg atttacactc tcctcttcac gcgtatcgtg 300
 gctcattcga ccaaccgat gcgtaagggc ttgtttgga aactggaacg cttgacagtt 360
 gccttctttg atagccacaa ggacggggat atactttctc gctttaccag tgatttggac 420
 25
 aatatccaaa acgctttcaa ccagtccttg acccaagtgg tgaccaacat cgctctttat 480
 gttggtatgg tcatcatgat gttccgctcag gatactcgtc tggccttggg gaccattgct 540
 30
 tctacgccag ttgccttgat tgccttggtc gttatcatcc gcctatcacg gaaatatacg 600
 gataagcaac aggtgcggg gtctaaactc aatgcctaca tggacgagaa aatttctgga 660
 caaaaagcga ttattgtaca aggtgtgcag gaagagacaa ttgatggttt cttggagctc 720
 35
 aatgaagaag ttcgtcgcac aactttcaag ggacgcttgt ttgggtgggatt tctcttccca 780
 tttatgaatg gtatgagttt ggtcaatacg gccattgtta tctttgcagg ttccagcatt 840
 40
 gttctcaatg acagctcact ggaaacagct gccgcacttg gtctgggtgg gacttttggt 900
 caatactcgc aacagtatta ccagccaatc atgcaggttg ctgccagctg ggcagaattg 960
 cagctagctt tcacaggagc tcatcgtatt caggaaatgt ttgatgagcc tgaggaagtt 1020
 45
 cgtcctcaaa acgctccgct atttaccgaa ttaaagaag gtggtgaaat taaggacatc 1080
 gactttggct acttgccagg tcagaaggctc ttggacaagg tgtctatctc tgctcctaag 1140
 50
 ggtaagatgg tggcggtcgt tggccgacg ggatctggta agactacat tatgaacttg 1200
 attaaccgct tctacgatgt caatgggtgg agtgtggcct ttgatggctg cgatattcgg 1260
 gaatatgatt tggatagctt gcggaataag gtcggtatcg tcttgagga gtcggtgta 1320
 55
 ttctcgggta ctattgcgga caatattcgc tttgggtgat agagcatttc gcaggaaatg 1380
 gtggaaaccg cagctcgtgc caccatatac cacgacttca tcatgagctt gccagagggc 1440
 60
 tatgaaacct ttgtgaccga tgatgagaat gtcttctcaa caggtcagaa acagttgatt 1500
 tccattgccc gtacgctttt gacagacca caagtcttga ttttggacga agcaacctca 1560

ES 2 662 801 T3

```

aacgttgata ccgtaacgga ggccaaaatt caaaaggcta tggaggccat tatcgagga      1620
cggactagct tcgtcattgc ccaccgctc aaaaccattc tcaatgcgga tgaatcatc      1680
5  gtcctcaagg atggaaaggt tatcgagcaa ggcaaccaca gccaacttct caaactaaat      1740
   ggcttctacg ccgaacttta ccacaaccag tttgtgtttg aa                        1782

10  <210> 6
    <211> 594
    <212> PRT
    <213> Streptococcus suis

15  <400> 6

Met Lys Thr Leu Arg Phe Phe Trp Phe Tyr Phe Lys Arg Tyr Lys Leu
1   5   10  15

20  Ser Phe Ala Val Ile Phe Leu Ala Ile Val Ala Ala Thr Tyr Leu Gln
   20  25  30

25  Val Lys Thr Pro Val Phe Leu Gly Asn Ala Ile Ala Glu Met Gly Lys
   35  40  45

30  Ile Gly Gln Ala Tyr Phe Met Ala Asn Gln Ala Gly Gln Ala Asp Phe
   50  55  60

35  Gln Pro Asp Met Ala Asp Phe Asn Gly Val Met Leu Asn Leu Phe Phe
   65  70  75  80

40  Ala Tyr Ala Ala Thr Val Val Ala Ser Leu Ile Tyr Thr Leu Leu Phe
   85  90  95

45  Thr Arg Ile Val Ala His Ser Thr Asn Arg Met Arg Lys Gly Leu Phe
   100 105 110

50  Gly Lys Leu Glu Arg Leu Thr Val Ala Phe Phe Asp Ser His Lys Asp
   115 120 125

55  Gly Asp Ile Leu Ser Arg Phe Thr Ser Asp Leu Asp Asn Ile Gln Asn
   130 135 140

60  Ala Phe Asn Gln Ser Leu Thr Gln Val Val Thr Asn Ile Ala Leu Tyr
   145 150 155 160

   Val Gly Met Val Ile Met Met Phe Arg Gln Asp Thr Arg Leu Ala Leu
   165 170 175

65  Val Thr Ile Ala Ser Thr Pro Val Ala Leu Ile Ala Leu Val Val Ile
   180 185 190

```

ES 2 662 801 T3

Ile Arg Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Asp Lys Gln Gln Ala Ala Val Ser
 195 200 205
 5
 Lys Leu Asn Ala Tyr Met Asp Glu Lys Ile Ser Gly Gln Lys Ala Ile
 210 215 220
 10
 Ile Val Gln Gly Val Gln Glu Glu Thr Ile Asp Gly Phe Leu Glu Leu
 225 230 235 240
 15
 Asn Glu Glu Val Arg Arg Thr Thr Phe Lys Gly Arg Leu Phe Gly Gly
 245 250 255
 20
 Ile Leu Phe Pro Phe Met Asn Gly Met Ser Leu Val Asn Thr Ala Ile
 260 265 270
 Val Ile Phe Ala Gly Ser Ser Ile Val Leu Asn Asp Ser Ser Leu Glu
 275 280 285
 25
 Thr Ala Ala Ala Leu Gly Leu Val Val Thr Phe Val Gln Tyr Ser Gln
 290 295 300
 30
 Gln Tyr Tyr Gln Pro Ile Met Gln Val Ala Ala Ser Trp Ala Glu Leu
 305 310 315 320
 35
 Gln Leu Ala Phe Thr Gly Ala His Arg Ile Gln Glu Met Phe Asp Glu
 325 330 335
 40
 Pro Glu Glu Val Arg Pro Gln Asn Ala Pro Leu Phe Thr Glu Leu Lys
 340 345 350
 Glu Gly Val Glu Ile Lys Asp Ile Asp Phe Gly Tyr Leu Pro Gly Gln
 355 360 365
 45
 Lys Val Leu Asp Lys Val Ser Ile Ser Ala Pro Lys Gly Lys Met Val
 370 375 380
 50
 Ala Val Val Gly Pro Thr Gly Ser Gly Lys Thr Thr Ile Met Asn Leu
 385 390 395 400
 55
 Ile Asn Arg Phe Tyr Asp Val Asn Gly Gly Ser Val Ala Phe Asp Gly
 405 410 415
 60
 Arg Asp Ile Arg Glu Tyr Asp Leu Asp Ser Leu Arg Asn Lys Val Gly
 420 425 430
 Ile Val Leu Gln Glu Ser Val Leu Phe Ser Gly Thr Ile Ala Asp Asn
 435 440 445

ES 2 662 801 T3

5 Ile Arg Phe Gly Asp Glu Ser Ile Ser Gln Glu Met Val Glu Thr Ala
 450 455 460
 Ala Arg Ala Thr His Ile His Asp Phe Ile Met Ser Leu Pro Glu Gly
 465 470 475 480
 10 Tyr Glu Thr Phe Val Thr Asp Asp Glu Asn Val Phe Ser Thr Gly Gln
 485 490 495
 15 Lys Gln Leu Ile Ser Ile Ala Arg Thr Leu Leu Thr Asp Pro Gln Val
 500 505 510
 20 Leu Ile Leu Asp Glu Ala Thr Ser Asn Val Asp Thr Val Thr Glu Ala
 515 520 525
 Lys Ile Gln Lys Ala Met Glu Ala Ile Ile Ala Gly Arg Thr Ser Phe
 530 535 540
 25 Val Ile Ala His Arg Leu Lys Thr Ile Leu Asn Ala Asp Glu Ile Ile
 545 550 555 560
 30 Val Leu Lys Asp Gly Lys Val Ile Glu Gln Gly Asn His Ser Gln Leu
 565 570 575
 35 Leu Lys Leu Asn Gly Phe Tyr Ala Glu Leu Tyr His Asn Gln Phe Val
 580 585 590
 40 Phe Glu

45 <210> 7
 <211> 1782
 <212> ADN
 <213> Streptococcus suis

<400> 7
 50 atgaagacgt tacgtttttt ctggttttat tttaaacgct ataaactgtc ctttgctgtg 60
 atttttctag ccattgtggc agcgacctac ctgcaggtta agacacctgt tttccttgga 120
 aatgccattg cggagatggg gaaaatcggg caggcttact ttatggccaa tcaagctggg 180
 55 caggctgact ttcagccaga catggctgat tttaacgggg ttatgctcaa tcttttcttt 240
 gcctatgcgg cgacggttgt ggcttccttg atttacactc tcctcttcac gcgtatcgtg 300
 gctcattcga ccaaccgtat gcataagggc ttgtttgga aactggaacg cttgacagtt 360
 60 gccttctttg atagccacaa ggacggggat atactttctc gctttaccag tgatttggac 420
 aatatccaaa acgctttcaa ccagtccttg acccaagtgg tgaccaacat cgctctttat 480

ES 2 662 801 T3

gttggtatgg tcatcatgat gttccgtcag gatactcgct tggccttggg gaccattgct 540
 5 tctacgccag ttgccttgat tgccttggtc gttatcatcc gcctatcacg gaaatatacg 600
 gataagcaac aggctgcggt gtctaaactc aatgcctaca tggacgagaa aatttctgga 660
 caaaaagcga ttattgtaca aggtgtgcag gaagagacaa ttgatggttt cttggagctc 720
 10 aatgaagaag ttcgtcgcac aactttcaag ggacgcttgt ttggtgggat tctcttccca 780
 tttatgaatg gtatgagttt ggtcaatacg gccattgtta tctttgcagg ttccagcatt 840
 15 gttctcaatg acagctcact ggaaacagct gccgcacttg gtctggtggg gacttttggt 900
 caatactcgc aacagtatta ccagccaatc atgcaggttg ctgccagctg ggcagaattg 960
 cagctagctt tcacaggagc tcatcgtatt caggaaatgt ttgatgagcc tgaggaagtt 1020
 20 cgtcctcaaa acgctccgct atttaccgaa ttaaagaag gtggtgaaat taaggacatc 1080
 gactttggct acttgccagg tcagaaggtc ttggacaagg tgtctatctc tgctcctaag 1140
 ggtaagatgg tggcggtcgt tgggccgacg ggatctggta agactacat tatgaacttg 1200
 25 attaaccgct tctacgatgt caatgggtgg agtgtggcct ttgatggtcg cgatattcgg 1260
 gaatatgatt tggatagctt gcggaataag gtcggtatcg tcttgcagga gtcggtgtta 1320
 30 ttctcgggta ctattgcgga caatattcgc tttggtgatg agagcatttc gcaggaaatg 1380
 gtggaaaccg cagctcgtgc cacccatata cagacttca tcatgagctt gccagagggc 1440
 35 tatgaaacct ttgtgaccga tgatgagaat gtcttctcaa caggtcagaa acagttgatt 1500
 tccattgccc gtacgctttt gacagacca caagtcttga ttttggacga agcaacctca 1560
 aacgttgata ccgtaacgga ggccaaaatt caaaaggcta tggaggccat tatcgcagga 1620
 40 cggactagct tcgtcattgc ccaccgctc aaaaccattc tcaatgcgga tgaaatcatc 1680
 gtcctcaagg atggaaagg t atcgagcaa ggcaaccaca gccaaacttct caaactaaat 1740
 45 ggcttctacg ccgaacttta ccacaaccag tttgtgtttg aa 1782

<210> 8
 <211> 594
 <212> PRT
 50 <213> Streptococcus suis
 <400> 8

55 Met Lys Thr Leu Arg Phe Phe Trp Phe Tyr Phe Lys Arg Tyr Lys Leu
 1 5 10 15
 Ser Phe Ala Val Ile Phe Leu Ala Ile Val Ala Ala Thr Tyr Leu Gln
 60 20 25 30
 Val Lys Thr Pro Val Phe Leu Gly Asn Ala Ile Ala Glu Met Gly Lys
 35 40 45

ES 2 662 801 T3

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

ES 2 662 801 T3

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

ES 2 662 801 T3

Val Ile Ala His Arg Leu Lys Thr Ile Leu Asn Ala Asp Glu Ile Ile
545 550 555 560

5 Val Leu Lys Asp Gly Lys Val Ile Glu Gln Gly Asn His Ser Gln Leu
565 570 575

10 Leu Lys Leu Asn Gly Phe Tyr Ala Glu Leu Tyr His Asn Gln Phe Val
580 585 590

Phe Glu

15

<210> 9
<211> 447
<212> ADN
20 <213> Streptococcus suis

<400> 9
atgggacata ctattgcaga ttttcggaac ttgctcaatc agattgaaca aattagttaa 60
25 accattgcaa aagaatacga tgtggagcac ttggctggtc cacagggctg ggccttgctc 120
ttcattgctg aacggctcga agccgaaacc tttgtaaaag atatagaagc ggaattaaag 180
30 atttccaaat cggttgccag caatctggtc aagagaatgg agaaaaatgg ctttatccaa 240
gtccttcctt ctaaggttga caaacgcttc aaacagctgg ttttgacaga gaagggacaa 300
gggaagatat gtcacctgaa agcttttcat gaagaaatgc accattcact tttttggggc 360
35 attcaaaaag aggactttga cttgggttaa caggtgggca atcaattaa agtaaatatt 420
caacgctata aggagaagaa tcatggtt 447

40 <210> 10
<211> 149
<212> PRT
<213> Streptococcus suis

45 <400> 10
Met Gly His Thr Ile Ala Asp Phe Arg Asn Leu Leu Asn Gln Ile Glu
1 5 10 15

50 Gln Ile Ser Glu Thr Ile Ala Lys Glu Tyr Asp Val Glu His Leu Ala
20 25 30

55 Gly Pro Gln Gly Trp Ala Leu Arg Phe Ile Ala Glu Arg Ser Glu Ala
35 40 45

60 Glu Thr Phe Val Lys Asp Ile Glu Ala Glu Leu Lys Ile Ser Lys Ser
50 55 60

Val Ala Ser Asn Leu Val Lys Arg Met Glu Lys Asn Gly Phe Ile Gln

ES 2 662 801 T3

```

65           70           75           80

5 Val Leu Pro Ser Lys Val Asp Lys Arg Phe Lys Gln Leu Val Leu Thr
  85          90

10 Glu Lys Gly Gln Gly Lys Ile Cys His Leu Lys Ala Phe His Glu Glu
  100        105        110

15 Met His His Ser Leu Phe Trp Gly Ile Gln Lys Glu Asp Phe Asp Leu
  115        120        125

20 Val Lys Gln Val Gly Asn Gln Leu Lys Val Asn Ile Gln Arg Tyr Lys
  130        135        140

25 Glu Lys Asn His Val
  145

<210> 11
<211> 447
<212> ADN
<213> Streptococcus suis

30 <400> 11
   atgggacata ctattgcaga ttttcggaac ttgctcaatc agattgaaca aattagtgaa      60
   accattgcaa aagaatacga tgtggagcac ttggctggtc cacagggctg ggccttgccg      120
   ttcattgcgg aacggtcgga agccgaaacc tttgtaaaag atatagaagc ggaattaaag      180
35   atttccaaat cggttgccag caatctggtc aagagaatgg agaaaaatgg ctttatccaa      240
   gtccttcct ctaaggttga caaatgcttc aaacagctgg ttttgacaga gaagggaaa      300
40   gggagaatat gtcacctgaa agcttttcat gaagaaatgc accattcact tttttggggc      360
   attcaaaaag aggactttga cttgggttaa caggtgggca atcaattaa agtaaattatt      420
45   caacgctata aggagaagaa tcatggtt                                     447

<210> 12
<211> 149
<212> PRT
50 <213> Streptococcus suis

<400> 12

55 Met Gly His Thr Ile Ala Asp Phe Arg Asn Leu Leu Asn Gln Ile Glu
   1          5          10          15

60 Gln Ile Ser Glu Thr Ile Ala Lys Glu Tyr Asp Val Glu His Leu Ala
   20          25          30

   Gly Pro Gln Gly Trp Ala Leu Arg Phe Ile Ala Glu Arg Ser Glu Ala
   35          40          45

```


REIVINDICACIONES

- 5 1. Cepa de *Streptococcus suis* (*S. suis*) atenuada capaz de proporcionar una respuesta inmunitaria segura y eficaz en animales porcinos contra *S. suis* o enfermedades causadas por *S. suis*, en la que la cepa tiene sustituciones de aminoácidos en los genes de virulencia rpsL-S12 (una proteína de la subunidad ribosomal 30S), una proteína de membrana de unión a ATP transportadora ABC (ABC-ATPBMP) y un regulador de la transcripción marR con respecto a la cepa de *S. suis* parental virulenta, en la que dicha cepa parental comprende ácidos nucleicos que codifican proteínas de tipo natural que tienen secuencias de péptidos, tal como se establecen en las SEQ ID NOs: 2, 6 y 10, y en la que la cepa atenuada tiene secuencias de ácido nucleico que codifican la secuencia de aminoácidos, tal como se establecen en las SEQ ID NOs: 10 4, 8 y 12.
2. Cepa, según la reivindicación 1, en la que la cepa atenuada tiene secuencias de ácido nucleico, tal como se establecen en la las SEQ ID NOs: 3, 7, y 11.
- 15 3. Cepa, según la reivindicación 1, en la que el nivel o niveles del péptido o péptidos expresados por el rpsL-S12, el ABC-ATPBMP y marR, se reducen con respecto a la cepa de *S. suis* parental que expresa los péptidos rpsL-S12, ABC-ATPBMP y marR que tienen las secuencias, tal como se establecen en las SEQ ID NOs: 2, 6, y 10.
- 20 4. Cepa, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** es la cepa depositada en la ATCC bajo el Depósito de Patente de Designación PTA-13269.
5. Composición inmunológica que comprende la cepa atenuada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 6. Composición, según la reivindicación 5, que comprende además un vehículo, diluyente o excipiente farmacéutica o veterinariamente aceptable, y un adyuvante seleccionado de quitosano, bacterias inactivadas, virus inactivados, fracciones de bacterias inactivadas, lipopolisacáridos bacterianos, toxinas bacterianas, o derivados o combinaciones de los mismos.
- 30 7. Composición, según la reivindicación 5, que proporciona una respuesta inmunitaria protectora en animales porcinos contra una estimulación con *S. suis* virulento.
8. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende además al menos un antígeno adicional asociado con un patógeno distinto de *S. suis*.
- 35 9. Uso de la cepa atenuada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la fabricación de la composición, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8.
10. Cepa atenuada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o composición, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para usar en terapia.
- 40 11. Cepa atenuada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o composición, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, para usar en provocar una respuesta inmunitaria protectora en un animal porcino contra *S. suis* o enfermedades causadas por *S. suis*.
- 45 12. Cepa atenuada o composición para usar, según la reivindicación 11, en las que el animal porcino es una cerda de aproximadamente 3 semanas a aproximadamente 6 semanas antes de parir, y en las que los lechones resultantes tienen una morbilidad y/o mortalidad reducida en comparación con los lechones procedentes de cerdas no vacunadas.