

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 948 841**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2011 E 16193491 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2023 EP 3135684**

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

30 Prioridad:

26.05.2010 US 348376 P

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

20.09.2023

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

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 948 841 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 de fusión recombinantes

5 Campo de la invención

La presente 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 y formular 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 confinada 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).

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

35

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 su uso como vacuna contra infecciones causadas por *S. equi*.

50

En 2004 se lanzó una vacuna comercial contra la adenitis equina, Equilis StrepE de Intervet, Reino Unido. 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 una 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 se han identificado y caracterizado 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. Los ejemplos de proteínas superficiales extracelulares de *S. equi* y *S. zooepidemicus* que se han caracterizado 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 se liberan al medio circundante SFS (Ref. 28), IdeE e IdeZ (Ref. 26), IdeE2 e IdeZ2 (Ref. 16). Estos tipos de proteínas son potenciales candidatos para su uso como componentes activos para fines de inmunización.

Los usos de este tipo de proteínas como componentes en una vacuna potencial para la 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. El documento WO 2004/032957 A1 desvela anticuerpos monoclonales contra uno o más antígenos de una composición de vacuna que comprende al menos epítomos antigénicos de la proteína EAG. La composición antigénica puede comprender además proteínas como SEC (sinónimo de CNE). El documento WO 2009/075646 A1 desvela formulaciones de vacunas que comprenden, por ejemplo, cinco (EAG, ScIC, CNE, EQ5 y Eq8) o siete (EAG, ScIC, CNE, Eq5, Eq8, IdeE y IdeE2) proteínas recombinantes de *S. equi*.

En 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.

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 las formas recombinantes de proteínas de *S. equi* localizadas de forma extracelular necesariamente sean funcionales como componentes de vacuna.

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*, una recuperación de bacterias significativamente reducida y niveles significativamente más bajos de rinorrea.

Aunque se han realizado muchos esfuerzos por desarrollar vacunas eficientes y algunos de los componentes inmunizadores presentados en las Ref. 14 y 15, los documentos WO 2004/032957 A1, WO2009/075646 A1, son candidatos prometedores para su uso en una vacuna que proteja contra la 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.

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 la 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 EndoS de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, o fragmentos de las mismas, como componente en una vacuna contra infecciones bacterianas o para suscitar una respuesta inmunógena o una respuesta inmunitaria protectora, se desvela en el documento WO 2011/059385 A1.

Breve resumen de la invención

La presente invención abarca una composición antigénica que comprende una pluralidad de componentes antigénicos obtenidos a partir de antígenos de *Streptococcus equi* subsp. *equi* o subsp. *zooepidemicus*. Los componentes antigénicos comprenden:

- (i) un primer polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 24 comenzando a partir del aminoácido 12;
- (ii) un segundo polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 22 comenzando a partir del aminoácido 12; y
- (iii) al menos parte de una proteína designada IdeE que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 26 comenzando a partir del aminoácido 12,

en la que dicha al menos parte de dicha proteína comprende al menos un epítipo antigénico.

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 no humanos.

De acuerdo con una realización adecuada, la presente invención se refiere a una vacuna que protege a 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 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. Los 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.

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).

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. Los 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.

En realizaciones particulares, la presente invención utiliza polipéptidos seleccionados entre las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 22 comenzando a partir del aminoácido 12, 24 comenzando a partir del aminoácido 12, y al menos una parte de una proteína designada IdeE que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la 26 comenzando a partir del aminoácido 12.

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 que pertenece la invención.

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.

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 de 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.

Muchas de las proteínas de *S. equi* tienen diferentes designaciones en diversos informes. Para facilitar la lectura de la presente solicitud, en la Tabla 1 a continuación se muestra la designación alternativa respecto a informes/solicitudes de patente previas.

Tabla 1

Presente solicitud	Referencias	Designación alternativa
CNE	WO 2004/032957 A1, WO 2009/075646 A1 Ref. 25	SEC
EAG	WO 2004/032957 A1, WO 2009/075646 A1 Ref. 11	
Eq8	WO 2009/075646 A1 Ref. 14	SEQ0402

(continuación)

Presente solicitud	Referencias	Designación alternativa
Eq5	WO 2009/075646 A1 Ref. 14	SEQ0256
A21	Ref. 22	ScIF
A36	Ref. 22	ScII
A42	WO 2004/032957 A1, WO 2009/075646 A1 Ref. 22	ScIC
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

- 5 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.
- 10 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.
- 15 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).
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 Descripción detallada de la invención
- Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a la identificación de polipéptidos o proteínas de *S. equi* o *S. zooepidemicus* en conformidad con la reivindicación 1 que sean capaces de suscitar una respuesta inmunógena, cuando se administran a un mamífero; y a la identificación de polinucleótidos o genes que codifican estos polipéptidos o proteínas.
- 40 Más específicamente, se desvela cómo fragmentos génicos de *S. equi* o de *S. zooepidemicus* 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 invención 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
- 45

misimos 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.

De acuerdo con una realización, la presente invención se dirige a una composición antigénica que comprende 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*, en conformidad con la reivindicación 1. Dicha al menos parte de una proteína o polipéptido comprende fragmentos de:

una proteína o polipéptido que se designa Eq85 y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 22 comenzando desde el aminoácido 12;
una proteína o polipéptido que se designa CCE y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 24 comenzando desde el aminoácido 12;
una proteína o polipéptido que se designa IdeE y tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 26 comenzando desde el aminoácido 12;
en la que al menos un antígeno es una proteína de fusión o un polipéptido.

El antígeno o antígenos mencionados anteriormente 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 de la invención 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 de la invención no están restringidas a las enumeradas anteriormente. En general, la invención puede 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.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones antigénicas pueden comprender antígenos 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 una 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 los 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 invención no está limitada al uso de *E. coli* y de 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 citada 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 de codones es bien conocida para los expertos en la materia.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a una composición de vacuna para proteger a mamíferos no humanos contra la infección por *S. equi*, que comprende una composición antigénica tal como se desvela anteriormente como componente inmunizador, y a un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Adecuadamente, la presente composición de vacuna 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, dicho adyuvante estimula la inmunidad sistémica o mucosal. Dichos adyuvantes se conocen bien en la técnica.

Los adyuvantes adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención comprenden (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 citada en el documento WO 2007/115059 A2.

Un adyuvante adecuado para su uso de acuerdo con la presente invención son los adyuvantes Abisco, Matrix C y Matrix Q de Isconova AB, Suecia. Los componentes clave de ISCOMS son saponinas de *Quillaia* obtenidas de la corteza del árbol *Quillaia jabonosa*, *Quillaia saponaria 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 una 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 suscita 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 fuerte respuesta de anticuerpos específicos de antígeno.
- De acuerdo con una realización adecuada, la composición de vacuna es una vacuna que protege a mamíferos susceptible, adecuadamente caballos, contra la adenitis equina causada por *S. equi*.
- La composición de vacuna de la presente invención 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 invención 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.
- La presente invención también se refiere a 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
- proporcionar un fragmento de ADN que codifica dicho antígeno e introducir dicho fragmento en un vector de expresión;
 - introducir dicho vector, que contiene dicho fragmento de ADN, en una célula hospedadora compatible;
 - cultivar dicha célula hospedadora proporcionada en la etapa (b) en las condiciones necesarias para la expresión del producto codificado por dicho fragmento de ADN; y
 - 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 invención se producen habitualmente de acuerdo con técnicas recombinantes.
- A modo de referencia, la presente divulgación se refiere a un método para la preparación de una vacuna de la presente invención, vacuna que contiene, como componente inmunizador, una composición antigénica tal como se ha desvelado anteriormente, comprendiendo dicho método mezclar dicha composición antigénica y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- La presente invención también se refiere a un método para la producción de un antisuero, comprendiendo dicho método administrar una preparación antigénica de la presente invención a un hospedador mamífero no humano para producir anticuerpos en dicho hospedador mamífero no humano y recuperar antisuero que contiene dichos anticuerpos producidos en dicho hospedador mamífero no humano.
- Además, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento profiláctico o terapéutico de la infección por *S. equi* en mamíferos, convenientemente caballos, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad inmunológicamente eficaz de una vacuna o un antisuero de la presente invención.
- Por consiguiente, la presente divulgación está relacionada con un método para proteger a los caballos contra la infección por *S. equi*, método que comprende inocular a un caballo por vía subcutánea, intranasal, intradérmica, oral o intramuscular, o cualquier combinación de las mismas, con una composición de vacuna de la presente invención, para inducir una respuesta inmunitaria contra *S. equi* en dicho caballo. Convenientemente, se induce una respuesta inmunitaria en forma de anticuerpos IgG y/o IgA y/o IgM en la mucosa nasofaríngea y/o el suero en dicho caballo.
- Las referencias al método de tratamiento profiláctico o terapéutico mediante terapia descrito anteriormente deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en los métodos.
- La presente invención proporciona una composición de vacuna en conformidad con la reivindicación 2 a 4, que se ha preparado 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 invención 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 procedentes de diferentes antígenos. Esta estrategia de fusión también podría ser adecuada para introducir una o más 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 invención también puede usarse en otras vacunas o composiciones inmunógenas de subunidad, donde la invención 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 invención y al menos un inmunógeno, antígeno o epítopo de WEEV, EEV, VEEV, virus de la gripe equina, EHV-1, EHV-4, EAV, WNV, tétanos, *Rhodococcus*.

PARTE EXPERIMENTAL

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

La cepa de *S. equi* subespecie *equi* 1866 (obtenida de Nordvacc Läkemedel AB, Suecia), (documento WO 2004/032957 A1, Ref. 25) se usó como fuente de ADN para clonación. El 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 los cebadores usados para amplificar los diversos fragmentos génicos se enumeran en las Tablas 2, 4 y 5. Se incluyeron sitios de escisión para enzimas de restricción en las secuencias de los cebadores. Se usó para la clonación y la expresión el plásmido vector pGEX-6P-1 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) (como alternativa se usó el vector pTYB4, New England Biolabs). 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, precalentar 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 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 más 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 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 los clones con el inserto esperado y se prepararon plásmidos. La secuencia del inserto respectivo también se determinó mediante secuenciación de ADN. Los clones correctos se transformaron en células competentes de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLys para la 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:	CACCCTCGAGTTATTGGCTTTGTTGATTAAGGTC
SEQ ID NO: 5. Eeq9:	cgtagagctctcggaaccaatccatc
SEQ ID NO: 6. Eeq10:	GAGGTCTAGAAGGACCTTGTTTGCCATTT
SEQ ID NO: 7. Eeq11:	agcatctagattatctgtgccgagga
SEQ ID NO: 8. Eeq12:	GAGGCTGCAGTGACCTCGGGTACCGCCTT
SEQ ID NO: 9. Eeq13:	agtactgcaggaccagccagcagcactaa
SEQ ID NO: 10. ScSac:	TGCAGAGCTCTGGCTTTTGGGCAGCTTCTTC
SEQ ID NO: 11. Eq8Bam:	catgggatccgcgactaccctagcaggac
SEQ ID NO: 12. Eq8Nco:	CTAGCCATGGGTGCTTAAGCTTTTCAATCTG
SEQ ID NO: 13. 85Nco:	agtacatgggaacgactactgtagtgc
SEQ ID NO: 14. Eq5C2:	CTGGCTCGAGTTATTAGCAACCAAGGCTGC
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

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 digirió con BamHI y NcoI. Además, un fragmento génico de *eq5* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores 85Nco y eq5C2. Después de la amplificación y la purificación, el fragmento se digirió 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 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
 GCTTAAAAATGAAGTCCATAAAAACTATCGTGGTAGTAATACTTGGCAAAAGCTTACCCT
 TATACTTAATGGTTATCAAAACCTTAGAGAACAATAGAGACCGAGCTAAAAAATAGTGA
 ACAAAAAGTAAAAGAGCTTAATGATAAGGTTAATAGTGAACTCAAGGAAAACAAGAGTT
 ACAGAATCAGCTTGAGAAAGAAAAAGAAGAGTTAGAAACACTAAAAAAGAGCTTGAAGC
 TGAGAAGGCTAAAGGAACTGGAGAAACAGAGAAGCTTCAAAAGGAAATTGAAGCAAAAAA
 TGCAATGATTTCTGACCTACAAAAACAGCTTGAGGAACTAAGCAAAGGGTTCAAGAGTT
 TGAAGCTGAAGTAGGTAAATTAATGGCCGAAAAGGCAGACCTACAAACAAAATTAAATGA
 ACAAGAGCAGCTTAACGCTAAGCTTCAAAAAGAAATTGAAGACTTAAAGGCTCAGATTGA
 AAAGCTTAAGCACCCATGGGAAACGACTACTGCTAGTGCATTTGAAAATAATGGGACAGG
 TCAACATCTGAAGTGGCACATAGATATTCACAAGAATATACAGTTGAATTAGGAGAACC
 AATTACTATCTCAGATCTTATGAGTCAAATTACGGTTACTCGTAAAGGTAGTAATGGGAC
 TGTTAATGATGGAGATACTTTTGACTTTATTTTGAATGGAGATGGTTCAAGAGGAATTGA
 TACCCCTGGAGTAAAAATATGGTTTGACTTTTACAATGCTGCGGGTACTTCCTTTTTTAAC
 TGATGAAATGTTAGCTTCGCCTACATATGCTGTACCGGGGGGATCTTATACTATTAAAGC
 TTGGGTATTCTATGGGAAAAATGATACCAAAAAGCTCTTCACATTTAACTAAAAAATTC
 CAACAGCAATAAACTGAGTTAAGGAAGTCGTTAGAGGAGGCTAAGCTAAACTCAGCCA
 GCCTGAAGGAACGTATTCTGATGAATCACTGCAAGCCTTGCAATCAGCGGTTACTATTGG
 TAAGACCTATTTAAACAGTGACCCTGATCAAAATACAGTAGATCAATCTGTTACTACTAT
 TGATTCCGCTATTACTAGTCTTGTTAATCTTAATGCTTTAAATGAAGCTATTAATCAAGC
 TACACCTTTTATAACAGATGGCAAAGAGTATCCTAAAGAAGCGTATGACGGTCTTGTGCA

AAAGCTTGCAGCGGCAGCTAAGCTTCAAAATTCATTTGGTCCTTCACAAGGAGATGTTGA
 TAAGGCTGCGACTGATTTAACGCAAGCTCTTACGACGCTTAAGACTGCTGTAGCGCATGA
 AGCCTTAGATCAAGCCTTGGCTAAGCTGTTAGAGCTTTACCGAGAAAATCCAAATCTTGC
 TTTGACATCAGAGTCTTTGAAGGAATTGTACAATAAGGCCATTGAAGCAGCAGGTACCTT
 CTATAGAACTGTTAACAAGGATAAAGAGAGAAAAGACATTTCCCTTTATGAGCTAGAGCG
 CTACACTACAGAAACAAATTCAGTTGTTGATACTATTTTAAAGGTAAAGGCTGCGATTGC
 CGAAGAAGGAAAGGCAAAATTGCGTTCTGCTTTAGACCAATTAAATGCTCTTATCGGAGA
 AAATCTAGACCTATCTCCATATACAGCAGCTTCTGCTCAAGCCTATACAGACCAGCTAGC
 TAAGGCTAAGGAGGTGCGCAGCAGCGGGTGAGACAGCTTATGCTCAGGAGACAGAACCGAC
 AGCTATTACTAACAGCTTGGTTAAGGTGTTAAATGCTAAGAAATCCCTCTCAGATGCCAA
 GGCAGCCTTGGTTGCTAAATAACTCGAGCGGCCGCATCGTG

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 usa 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/; http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_equi/

LEVL⁵FQ*GPLGSATTLA¹⁰GQTEVRADNILRLDMTDKEAVEKFANELKNEVHKNYRGSNTWQK
 LTLILNGYQNLREQIETELKNSEQKVKELN¹⁵DKVNSETQ²⁰GKQELQ²⁵NQLEKEKEELETLKKE
 LEAEKAKGTGETEKLQKEIEAKNAMI³⁰SDLQKQLEETKQ³⁵RVQEF⁴⁰AEV⁴⁵GK⁵⁰LMAEKADLQTK
 LNEQEQLNAKLQKEIEDLKAQIEKLKH⁵⁵PWETTTASAFENNGTG⁶⁰QHLN⁶⁵WHIDIPQEYTVEL
 GEPITISDLMSQITVTRKGSNGTVNDGDTFDFISNGDGSRGIDTPGVKIWFDFYNAAGTS
 FLTDEMLASPTYAVPGGSYTIKAWVFY⁷⁵GKNDTKKLFTFKLKNSNSNKT⁸⁰ELRKSLEEAKLK
 LSQPEGTYSD⁸⁵ESLQALQSAVTIGKTYLNSDPDQNTVDQSVTTIDSAITSLVNLNALNEAI
 NQATPFITDGKEYPKEAYDGLVQKLAA⁹⁰AAKLQNSFGPSQGDVDKAATDLTQALTTLKTA⁹⁵V
 AHEALDQALAKLLELYRENPNLALTSES¹⁰⁰LKELYNKAIEAAGTFYRTV¹⁰⁵NKDKERKDISLYE
 LERYTTETNSVVD¹¹⁰TILKVKAIAEEGKAKLRSALDQLNALIGENLDLSPYTAASAQAYTD
 QLAKAKEVAAAGETAYAQETEPTAITNSLVKVLNAKKSLS¹¹⁵DAKAALVAK

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

15 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 la amplificación y la 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 la amplificación y la purificación, el fragmento se digirió con SacI y XhoI. Los fragmentos *cne* y *eag* purificados se ligaron en el vector escindido con BamHI y XhoI, pGEX-6P-1. Después de la transformación en *E. coli*, se identificó un clon correcto y se indicó como pCNEEAG. Seguidamente, un fragmento génico de *eq21* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores eqc9 y eqc10. Después de la amplificación y la 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 la amplificación y la 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 la amplificación y la 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*.

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

CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCTGGGATCCACTAATCTTAGTGACAACATCACATCA
TTGACGGTTGCTTCTTCATCACTCCGAGATGGAGAGAGAACGACGGTAAAGGTTGCGTTT
GATGACAAAAACAGAAAATCAAGGCAGGGGATACGATAGAGGTCACCTGGCCTACAAGT
GGTAATGTCTACATTCAGGGCTTTAATAAAACCATACCGCTTAATATTAGAGGGGTAGAT
GTTGGTACCTTGAGGTCACGCTAGACAAGGCTGTTTTTACATTCAATCAAAATATTGAA
ACAATGCATGATGTCTCTGGTTGGGGAGAGTTTGATATTACTGTTAGAAATGTGACACAA
ACCACCGCTGAAACATCAGGAACGACCACAGTAAAGGTAGGCAATCGCACTGCTACTATC
ACTGTTACTAAGCCTGAGGCAGGCACTGGTACCAGCTCATTTTATTATAAGACTGGTGAT
ATGCAGCCCAATGATACTGAGCGTGTGAGATGGTTCCTGCTGATTAACAACAACAAGGAA
TGGGTGGCCAATACTGTTACAGTCGAAGACGATATTCAGGTGGTCAAACCTTGGATATG
AGCAGCTTTGACATCACCGTATCTGGTTATCGTAACGAGCGCTTCGTTGGGGAAAACGCT
CTGACAGAGTTTCATACAACATTTCCAAATTCTGTCATTACGGCAACAGATAATCACATT
AGTGTGCGGTTAGATCAATATGATGCCTCACAAAACACTGTCAACATTGCTTATAAGACA
AAGATAACGGACTTTGACCAAAAAGAATTTGCCAACAACAGTAAAATCTGGTACCAGATT
TTATACAAGGATCAGGTATCGGGTCAAGAGTCAAACCACCAAGTAGCCAATATCAATGCT
AACGGCGGGGTTGATGGCAGTCGCTATACCAGCTTTACTGTCAAGGAGCTCTCGGAACCC
AATCCATATCCAGATGTGAGGCGTTTCCTTGATGAGAAGTACGATGGAGATGTGGATAAA
TTATCTAAACAACCTTCAAGGTTATTTTGGTAGTTTAAGAGAGTATATAGAGTTTGAACCTT
AAAAATGGCAAACAAGGTCCTTCTAGATTATCTGGTCCGCCAGGATACCCACTTACTCGT
GATTTCTCCCGTAACTTCCTAGAAGAAAATACTGCAAAATATTTAGATCAATTAAGAGAA
CATCTACAGCACAGATTTAGTGAACCTTGAGAGCTTAACAAGAAAATTAGAGAAAGAAGGC
GGTACCCGAGGTCCACTGCAGGACCAGCCAGCAGCACTAAAATATCCAGAACCTAGAGAC
TATTTTCTTCATACTCGTGAAGGTGATGTTATTTATGATGAGGATATAAAAAGATATTTT
GAGGATTTAGAAGCCTATTTAACAGCTAGACTTGGTGGGATTGATAAAAAAGTAGAAGAA
GCTGCCCAAAAGCCAGAGCTCTTAGACGCAGCAACAGTGTTAGAGCCTACAACAGCCTTC
ATTAGAGAAGCTGTTAGGGAAATCAATCAGCTGAGTGATGACTACGCTGACAATCAAGAG
CTTCAGGCTGTTCTTGCTAATGCTGGAGTTGAGGCACTTGCTGCAGATACTGTTGATCAG
GCTAAAGCAGCTCTTGACAAAGCAAAGGCAGCTGTTGCTGGTGTTCAGCTTGATGAAGCA
AGACGTGAGGCTTACAGAACATCAATGCCTTAAGTGATCAGCACAAAAGCGATCAAAAG
GTTTACGCTAGCTCTAGTTGCTGCAGCAGCTAAGGTGGCAGATGCTGCTTCAGTTGATCAA
GTGAATGCAGCCATTAATGATGCTCATACAGCTATTGCGGACATTACAGGAGCAGCCTTG
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 usa otra estrategia de fusión.

LEVL**FQ***GPLGSTNLSDNITSLTVASSSLRDGERTTVKVA**FDDKKQ**KIKAGDTIEVTWPTS
 GNVYIQGFNKTIPLNIRGVDVGTLEVTLDKAVFTFNQNIETMHDVSGWGEFDITVRNVTQ
 TTAETSGTTTVKVGNRATITVTKPEAGTGTSSFYK**TGDMQ**PNDTERVRWFLLINNNKE
 WVANTVTVEDDIQGGQTLDMSSFDITVSGYRNERFVGENALTEFHTT**FPNSV**ITATDNHI
 SVRLDQYDASQNTVNIAYKTKITDFDQKEFANNSKI**WYQ**ILYKDQVSGQESNHQVANINA
 NGGVDGSRYTSFTVK**EL**SEPNPYPDVRRFLDEKYDGDVDKLSKQLQGYFGSLREYIEFEL
 KNGKQGP**SRL**SGPPGYPLTRDFSRNFLEENTAKYLDQLREHLQHRFSELES**LRKLE**KEG
 GTRGP**LQ**DQPAALKYPEPRDYFLHTREGDVIYDEDIKRYFEDLEAYLTARLGGIDKKVEE
 AAQKP**ELL**DAATVLEPTTAFIREAVREINQLSDDYADN**QELQ**AVLANAGVEALAADTV**DQ**
 AKAALDKAKAAVAGVQLDEARREAYRTINALSDQHKS**DQKVQ**LALVAAA**AKV**ADAASVDQ
 5 VNAAINDAHTAIADITGAALLEAKEAAINELKQYGISDYV**TLINKAK**

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 la amplificación y la purificación, el fragmento se digirió con BamHI y XhoI y se ligó en el vector escindido con BamHI y XhoI pGEX-6P-1.

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
 CTAACACCCGAGCAGTTTCGATATAATAACGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCT
 CATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGC
 GCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAA
 GCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAAATCATTTTTTAACAACCAAGAGCTATTT
 GATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTTAATTAT
 TTTAGAGATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTT
 GTTCTAGACATGTTTATCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGAT
 GTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCC
 AGAGGAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAAT
 GACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACAT
 ACCTACGCCAATGTTAGCATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCT
 GAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATG
 AAAAAATATTTTGTGCGCATTAATGCTCATAGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAATA
 GAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGAC
 ATATGGCAGAACTGAGCTAA**CTCGAGCGGCCG**CAT

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.

LEVL FQ *GPLGSDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLA
 HQGWYDITKA FDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKII FNNQELF
 DLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTD
 VNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSH
 TYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAH RHVAISAKKI
 EGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

5 Ejemplo comparativo 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 la amplificación y la 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 la amplificación y la purificación, el fragmento se digirió con SacI y XhoI. Ambos fragmentos se ligaron en el vector escindido con BamHI y XhoI pGEX-6P-1.

SEQ ID NO: 27. Que muestra la secuencia de nucleótidos del fragmento de fusión génico de *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.

CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCACTAATCTTAGTGACAACATCACATCA
 TTGACGGTTGCTTCTTCATCACTCCGAGATGGAGAGAGAACGACGGTAAAGGTTGCGTTT
 GATGACAAAAACAGAAAATCAAGGCAGGGGATACGATAGAGGTCACCTGGCCTACAAGT
 GGTAATGTCTACATTCAGGGCTTTAATAAAACCATACCGCTTAATATTAGAGGGGTAGAT
 GTTGGTACCTTGAGGTCACGCTAGACAAGGCTGTTTTACATTCAATCAAAATATTGAA
 ACAATGCATGATGTCTCTGGTTGGGGAGAGTTTGATATTACTGTTAGAAATGTGACACAA

ACCACCGCTGAAACATCAGGAACGACCACAGTAAAGGTAGGCAATCGCACTGCTACTATC
 ACTGTTACTAAGCCTGAGGCAGGCACTGGTACCAGCTCATTTTATTATAAGACTGGTGAT
 ATGCAGCCCAATGATACTGAGCGTGTGAGATGGTTCCTGCTGATTAACAACAACAAGGAA
 TGGGTGGCCAATACTGTTACAGTCGAAGACGATATTCAAGGTGGTCAAACCTTGGATATG
 AGCAGCTTTGACATCACCGTATCTGGTTATCGTAACGAGCGCTTCGTTGGGGAAAACGCT
 CTGACAGAGTTTCATACAACATTTCCAAATTCTGTCATTACGGCAACAGATAATCACATT
 AGTGTGCGGTTAGATCAATATGATGCCTCACAAAACACTGTCAACATTGCTTATAAGACA
 AAGATAACGGACTTTGACCAAAAAGAATTTGCCAACAACAGTAAAATCTGGTACCAGATT
 TTATACAAGGATCAGGTATCGGGTCAAGAGTCAAACCACCAAGTAGCCAATATCAATGCT
 AACGGCGGGGTTGATGGCAGTCGCTATACCAGCTTTACTGTCAAGGAGCTCTTAGACGCA
 GCAACAGTGTTAGAGCCTACAACAGCCTTCATTAGAGAAGCTGTTAGGGAAATCAATCAG
 CTGAGTGATGACTACGCTGACAATCAAGAGCTTCAGGCTGTTCTTGCTAATGCTGGAGTT
 GAGGCACTTGCTGCAGATACTGTTGATCAGGCTAAAGCAGCTCTTGACAAAGCAAAGGCA
 GCTGTTGCTGGTGTTGAGCTTGATGAAGCAAGACGTGAGGCTTACAGAACAATCAATGCC
 TTAAGTGATCAGCACAAAAGCGATCAAAGGTTGAGCTAGCTCTAGTTGCTGCAGCAGCT
 AAGGTGGCAGATGCTGCTTCAGTTGATCAAGTGAATGCAGCCATTAATGATGCTCATACA
 GCTATTGCGGACATTACAGGAGCAGCCTTGTTGGAGGCTAAAGAAGCTGCTATCAATGAA
 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 usa otra estrategia de fusión.

LEVLFQ*GPLGSTNLSDNITSLTVASSSLRDGERTTVKVAFDKKQKIKAGDTIEVTWPTS
 GNVYIQGFNKTIPLNIRGVDVGTLEVTLDKAVFTFNQNIETMHDVSGWGEFDITVRNVTQ
 TTAETSGTTTVKVGNRATITVTKPEAGTGTSSFYKTDGMPNDTERVRFLLINNNKE
 WVANTVTVEDDIQGGQTLDMSSFIDITVSGYRNERFVGENALTEFHTTFPNSVITATDNHI
 SVRLDQYDASQNTVNIAYKTKITDFDQKEFANNISKIYQILYKDQVSGQESNHQVANINA
 NGGVDGSRYTSFTVK**ELL**DAATVLEPTTAFIREAVREINQLSDDYADNQELQAVLANAGV
 EALAADTVDQAKAALDKAKAAVAGVQLDEARREAYRTINALSDQHKSDQKVQLALVAAAA
 KVADAASVDQVNAAINDAHTAIADITGAALLEAKEAAINELKQYGISDYVTLINKAK

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

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

20 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.

CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAA
 GCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAGATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCA
 CTAACACCCGAGCAGTTTCGATATAATAACGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCT
 CATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGC
 GCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAA
 GCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAGCAAAAATCATTTTTTAACAACCAAGAGCTATTT
 GATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAATAGTCAGCTTTTTAATTAT
 TTTAGAGATAAAGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTATGCCTGATCTT
 GTTCTAGACATGTTTATCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGAT
 GTCAATCGACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACC
 AGAGGAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAAT
 GACATCAGCACCATTATCAAGCAAGAAGTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACAT
 ACCTACGCCAATGTTAGCATTAGCCATGTGATTAACTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCT
 GAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATG
 AAAAAATATTTTGTGCGCATTAATGCTCATAGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAATA
 GAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATTAGGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGGAC
 ATATGGCAGAACTGAGCCCATGGGAAACGACTACTGCTAGTGCATTTGAAAATAATGGG
 ACAGGTCAACATCTGAACTGGCACATAGATATCCACAAGAATATACAGTTGAATTAGGA
 GAACCAATTACTATCTCAGATCTTATGAGTCAAATTACGGTTACTCGTAAAGGTAGTAAT
 GGGACTGTTAATGATGGAGATACTTTTGACTTTATTTTCAATGGAGATGGTTCAAGAGGA
 ATTGATACCCCTGGAGTAAAAATATGGTTTGACTTTTACAATGCTGCGGGTACTTCCTTT
 TTAAGTATGAAATGTTAGCTTCGCCTACATATGCTGTACCGGGGGGATCTTATACTATT
 AAAGCTTGGGTATTCTATGGGAAAAATGATACCAAAAAGCTCTTCACATTTAACTAAAA
 AATTCCAACAGCAATAAACTGAGTTAAGGAAGTCGTTAGAGGAGGCTAAGCTAAAATC

AGCCAGCCTGAAGGAACGTATTCTGATGAATCACTGCAAGCCTTGCAATCAGCGGTTACT
 ATTGGTAAGACCTATTTAAACAGTGACCCTGATCAAATACAGTAGATCAATCTGTTACT
 ACTATTGATTCCGCTATTACTAGTCTTGTTAATCTTAATGCTTTAAATGAAGCTATTAAT
 CAAGCTACACCTTTTATAACAGATGGCAAAGAGTATCCTAAAGAAGCGTATGACGGTCTT
 GTGCAAAAGCTTGACGCGCAGCTAAGCTTCAAAATTCATTTGGTCCTTCACAAGGAGAT
 GTTGATAAGGCTGCGACTGATTTAACGCAAGCTCTTACGACGCTTAAGACTGCTGTAGCG
 CATGAAGCCTTAGATCAAGCCTTGGCTAAGCTGTTAGAGCTTTACCGAGAAAATCCAAAT
 CTTGCTTTGACATCAGAGTCTTTGAAGGAATTGTACAATAAGGCCATTGAAGCAGCAGGT
 ACCTTCTATAGAAGCTGTTAACAAGGATAAAGAGAGAAAAGACATTTCCCTTTATGAGCTA
 GAGCGCTACACTACAGAAACAAATTCAGTTGTTGATACTATTTTAAAGGTAAAGGCTGCG
 ATTGCCGAAGAAGGAAAGGCAAAATTCGCTTCTGCTTTAGACCAATTAATGCTCTTATC
 GGAGAAAATCTAGACCTATCTCCATATACAGCAGCTTCTGCTCAAGCCTATACAGACCAG
 CTAGCTAAGGCTAAGGAGGTCGCAGCAGCGGGTGAGACAGCTTATGCTCAGGAGACAGAA
 CCGACAGCTATTACTAACAGCTTGGTTAAGGTGTTAAATGCTAAGAAATCCCTCTCAGAT
 GCCAAGGCAGCCTTGGTTGCTAAATAA**CTCGAGCGGCCGCAT**

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 usa 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/;

LEVLFQ*GPLGSDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLA
 HQGWYDITKAFDGKDNLLCGAATAGNMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELF
 DLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTD
 VNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSH
 TYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHRHVAISAKKI
 EGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS**PW**ETTTASAFENNGTGQHLNWHIDIPQEYTVELG
 EPITISDLMSQITVTRKGSNGTVNDGDTDFDISNGDGSRGIDTPGVKIWFDFYNAAGTSF
 LTDEMLASPTYAVPGGSYTIKAWVFYGKNDTKKLFTFKLKNSNSNKTELRSLEEAKLKL
 SQPEGTYSDESLQALQSAVT**IG**KTYLNSDPDQNTVDQSVTTIDSAITSLVNLNALNEAIN
 QATPFITDGKEYPKEAYDGLVQKLAAAKLQNSFGPSQGDVDKAATDLTQALTTLKTAVA
 HEALDQALAKLLELYRENPALTSLSKELYNKAI EAAGTFYRTVNKDKERKDISLYEL
 ERYTTETNSVVDITLKVKAIAEEGKAKLRSALDQLNALIGENLDLSPYTAASAQAYTDQ
 LAKAKEVAAAGETAYAQETEPTAITNSLVKVLNAKKSLSDAKAALVAK

Ejemplo comparativo 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 la amplificación y la purificación, el fragmento se digirió con BamHI y XhoI y se ligó en el vector escindido con BamHI y XhoI pGEX-6P-1.

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.

CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCGAGGATAAGGTTGTGCAAACTAGTCCA
 TCAGTCTCTGCTATTGATGACCTACATTACCTGTCGGAAAACAGTAAAAAGAATTTAAG
 GAGGGGTTATCAAAGGCAGGAGAAGTACCTGAAAAGCTAAAGGATATTTTATCCAAGGCA
 CAGCAGGCAGATAAGCAGGCAAAGGTTCTTGCAGAAATGAAGGTTCTTGAAAAATAGCC
 ATGAAGCCTTTAAAGGGGCTCTTTATGGTGGCTATTTTAGGACTTGGCATGATAAAACA
 TCAGATCCGGCTGAAAAGGATAAGGTTAATTCTATGGGAGAATTGCCTAAGGAGGTTGAC
 TTAGCCTTTGTTTTCCATGATTGGACCAAGGATTATAGCTTTTTCTGGCAAGAATTGGCG
 ACCAAGCATGTGCCAACGCTGAACAAGCAGGGAACACGTGTGATTTCGTACCATTCATGG
 CGGTTCTTGCAGGCGGTGATCATAGTGGTATTGCTGAAGATACGCAAAAATACCCAAAT
 ACTCCAGAGGGAAATAAGGCCTTGGCAAAGGCTATTGTAGATGAATACGTTTATAAATAT
 AATCTTGATGGTTTAGATGTTGATATTGAGCGGGATAGCATTCCAAAAGTAAATGGAAAA
 GAGAGTAACGAAAATATTCAGCGCTCTATTGCTGTTTTTGAAGAAATTGGCAAGCTTATT
 GGGCCAAAGGGCGCTGACAAGTCACGTTTGTTCATTATGGATAGCACCTACATGGCTGAC
 AAGAACCCATTGATTGAGCGCGGTGCCCAATATATTGATTTGCTGCTTGTGCAGGTTTAT
 GGCACTCAAGGTGAGAAGGGAGATTGGGATCCAGTCGCTAGAAAACCTGAAAAGACAATG
 GAGGAACGTTGGGAATCGTATAGCAAATACATTCGTCCTGAGCAGTACATGGTTGGTTTT
 TCTTTCTATGAGGAATATGCGGGCAGTGGTAACCTCTGGTATGATATTAATGAGAGGAAA
 GATGATCATAATCCGTTAAATTCAGAGATAGCTGGTACTCGTGCTGAGCGTTATGCAAAA
 TGGCAGCCTAAGACAGGTGGTGTCAAGGGAGGGATTTTCTCTTATGCGATTGATCGCGAT
 GGTGTAGCGCATCAACCTAAAAAGTCTCAGATGATGAGAAAAGAACTAACAAGGCTATA
 AAGGATATAACAGATGGTATTGTCAAATCAGATTATAAGGTTTCTAAGGCCTTGAAGAAG
 GTTATGAAAATGACAAATCCTATGAGCTGATTGATCAGAAAGATTTTCCAGACAAGGCT
 TTGCGAGAAGCAGTTATTGCACAGGTTGGAAGCAGAAGAGGGGATTTAGAGCGGTTCAAT
 GGAACCTGCGCTTAGACAATCCGGATATCAAGAGTTTAGAAGGCCTGAATAAGCTTAAA

AAACTAGCTAAGCTAGAGCTAATCGGTCTATCACAAATCACAAAGCTGGATAGCTTAGTC
 CTACCTGCAAATGCTAAGCCGACCAAGGATACGCTGGCCAATGTTCTTGAAGCCTACGAC
 AGCGCTAAGAAGGAAGAGACTAAGGCGATTCCACAGGTGGCTCTGACCATTCTGGTCTA
 ACTGGCTTGAAGGAATTAAATCTTGCTGGCTTTGATCGTGATAGCTTGGCTGGAATTGAC
 GCAGCTAGCCTAACCTCTCTTGAAAAGGTGGATCTCTCTAGTAATAAGCTGGACTTAGCA
 GCTGGTACGGAAAATCGTCAGATTCTTGATACCATGCTGGCAACAGTGACTAAGCATGGC
 GGTGTTAGCGAAAAGACGTTTGTATTTGATCATCAAAGCCTACTGGTCTTTATCCTGAT
 ACTTATGGCACTAAGAGCCTTCAGTTACCAGTAGCAAATGATACAATTGATTTGCAGGCT
 AAGCTTTTATTTGGAACAGTTACCAATCAGGGCACGCTAATCAATAGCGAAGCTGACTAT
 AAGGCTTATCAGGAGCAGGAAATAGCAGGTCACCGTTTTGTTGATTCAAGCTATGATTAC
 AAAGCCTTTGCAGTGACCTACAAGGACTATAAGATCAAGGTGACTGACTCAACCTTAGGT
 GTCAGTATCACAAGGACTTATCCACTAGCAAGGAGGAGACCTACAAGGTTGAATTCTTT
 AGCCCTACTAATAGCACTAAGCCTGTGCATGAGGCTAAGGTTGTCGTTGGTGCGGAAAAA
 ACCATGATGGTTAACCTAGCAGAGGGAGCAACTGTGATTGGTGGTGATGCAGATCCAACA
 AATGCAAAAAAAGTGTTTGATGGTTTGCTCAATAATGATACAACAATTCTGTCAACTAGC
 AATAAAGCTTCTATCATTTTTGAACTTAAAGAGCCTGGCTTAGTCAAGTATTGGCGTTTC
 TTTAATGACAGCAAAATTAGTAAAGCTGACTGTATTAAGGAGGCCAAGCTTGAAGCCTTT
 GTTGGCCATCTTGAAGCTGGCTCAAAGGTAAAGGATAGCTTGGAAAAATCATCAAATGG
 GTAACAGTTTCAGATTATTCAGGAGAGGACCAAGAGTTTAGCCAGCCGTTAAACAACATT
 GGTGCCAAATATTGGAGAATAACAGTTGATACTAAGGGAGGACGTTACAATTGGCCATCA
 CTTCTGAGCTTCAAATCATTGGTTATCAATTACCGGCTGCGGATCTTGTGATGGCAATG
 CTAGCTACTGCAGAGGAGCTATCTCAGCAAAAAGACAAGTTCTCTCAAGAGCAGCTTAAG
 GAGCTCGAAGTCAAATAGCTGCCTTAAAGGCTGCTTTAGATAGTAAGATGTTTAATGCC
 GATGCTATTAACGCTAGTACTGCTGATCTGAAGGCTTATGTTGATAAGCTTTTAGCTGAT
 AGAACTGATCAGGAAAAAGTAGCTAAAGCAGCTAAAGTTGAGCAGCCTGTGGCTACTGAC
 ATAAAAGAAAATACTGAGCCAGAAAATCCAAAGACAGACTAGCTTATCCCTCGAGCGGCC
GCAT

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.

5 Nótese que el aminoácido Y en negrita y cursiva es diferente en esta posición en comparación con la secuencia publicada en http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_equi/:

LEVLFQ*GPLGSEDKVVQTSSPSVSAIDDLHYLSENSKKEFKEGLSKAGEVPEKLKDILSKA
 QQADKQAKVLAEMKVPEKIAMKPLKGPLYGGYFRTWHDKTS DPAEKDKVNSMGELPKEVD
 LAFVFHDWTKDYSFFWQELATKHVPTLNKQGTRVIRTIPWRFLAGGDHSGIAEDTQKYPN

TPEGNKALAKAIVDEYVYKYNLDGLDVDIERDSIPKVNGKESNENIQRSIAVFEEIGKLI
 GPKGADKSRLFIMDSTYMADKNPLIERGAQYIDLLLVQVYGTQGEKGDWDPVARKPEKTM
 EERWESYSKYIRPEQYMGVGSFYEEYAGSGNLWYDINERKDDHNPLNSEIAGTRAERYAK
 WQPKTGGVKGIGFSYAIDRDGVAHQPKKVSDEKRTNKAIKDITDGIVKSDYKVSALKKK
 VMENDKSYELIDQKDFPDKALREAVIAQVGSRRGDLERFNGTLRLDNPDIKSLEGLNKLK
 KLAKELELIGLSQITKLDLVL PANAKPTKDTLANVLEAYDSAKKEETKAIPQVALTISGL
 TGLKELNLAGFDRDSL AGIDAASLTSLEKVDLSSNKLDLAAGTENRQILD TMLATVTKHG
 GVSEKTFVFDHQPTGLYPDTYGTSLQLPVANDTIDLQAKLLFGTVTNQGT LINSEADY
 KAYQE QE IAGHRFVDSSYDYKAFAV TYKDYKIKVTDSTLGVT DHKDLST SKEETYKVEFF
 SPTNSTKPVHEAKVVVGA EKTMMVNLAEGATVIGGDADPTNAKKVFDGLLNNDTTILSTS
 NKASII FELKEPGLVKYWRFFND SKISKADCIKEAKLEAFVGHLEAGSKVKDSLEKSSKW
 VTVSDYSGEDQEFSQPLNNIGAKYWRITVDTKGGRYNWPSLP ELQIIIGYQLPAADLVMAM
 LATAEELSQQKDKFSQEQLKELEV KIAALKAALDSKMFNADAINASTADLKAYVDKLLAD
 RTDQEKVAKAAKVEQP VATDIKENTEPENPKTD

Ejemplo comparativo 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 la amplificación y la 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 la amplificación y la purificación, el fragmento se digirió con SacI y XbaI. Los dos
 10 fragmentos de ADN escindidos se ligaron en la construcción CNEEAG escindida previamente con SacI, generando un clon que alberga los fragmentos génicos en el siguiente orden *cne*-*eq54*-*eq36*-*eq42*-*eag*.

- 15 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.

CTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCCCTGGGATCCACTAATCTTAGTGACAACATCACATCA
 TTGACGGTTGCTTCTTCATCACTCCGAGATGGAGAGAGAACGACGGTAAAGGTTGCGTTT
 GATGACAAAAAACAGAAAATCAAGGCAGGGGATACGATAGAGGTCACCTGGCCTACAAGT
 GGTAATGTCTACATTCAGGGCTTTAATAAAACCATACCGCTTAATATTAGAGGGGTAGAT
 GTTGGTACCTTGAGGTCACGCTAGACAAGGCTGTTTTACATTCAATCAAATATTGAA

ACAATGCATGATGTCTCTGGTTGGGGAGAGTTTGATATTACTGTTAGAAATGTGACACAA
ACCACCGCTGAAACATCAGGAACGACCACAGTAAAGGTAGGCAATCGCACTGCTACTATC
ACTGTTACTAAGCCTGAGGCAGGCACTGGTACCAGCTCATTTTATTATAAGACTGGTGAT
ATGCAGCCCAATGATACTGAGCGTGTGAGATGGTTCCTGCTGATTAACAACAACAAGGAA
TGGGTGGCCAATACTGTTACAGTCGAAGACGATATTCAAGGTGGTCAAACCTTGGATATG
AGCAGCTTTGACATCACCGTATCTGGTTATCGTAACGAGCGCTTCGTTGGGGAAAACGCT
CTGACAGAGTTTCATACAACATTTCCAAATTCTGTCATTACGGCAACAGATAATCACATT
AGTGTGCGGTTAGATCAATATGATGCCTCACAAAACACTGTCAACATTGCTTATAAGACA
AAGATAACGGACTTTGACCAAAAAGAATTTGCCAACAACAGTAAAATCTGGTACCAGATT
TTATACAAGGATCAGGTATCGGGTCAAGAGTCAAACCACCAAGTAGCCAATATCAATGCT
AACGGCGGGGTTGATGGCAGTCGCTATACCAGCTTTACTGTCAAGGAGCTCGATACAGCA
AGCTATACCATCACTGTTGAGGGAGCTACAGCAGGTCACACCTATGAGGCTTATCAGATT
TTCAAGGGTGACTTGTTTGACAGTACCCTATCAAACATCACATGGGGAGGTGGTGTTACA
CCTTTTGAATTTGATGGTTCAAAAGACGCTGCTAAGATTGCAGAGGGATTGAAGGAAGCA
AATGCAGCTGCCTTTGCCAAGGAAGCAGGTAAGCACTTGACAGCAACCATTCAGGAACA
GGAACACATGCAATCACCGTTAACGAGGCTGGCTACTACCTCATCAAGGACAAAAATGAT
TCTCAAACAGGCAAGCATGACGCCTACACCTCATTTGTCTGAAGGTTGTTAAAAACACC
AGCTTCAAACCAAAAATCTGCTATCCCAACAGTCCTTAAAAAGGTCAAGGACCGTAATGAC
AAGACAGGTCTTGAGACAGGCTGGCAAGATTCAGCTGACTATGACAAAAATGACAAGGTG
CCATTCCAGCTAACCGCAACCCTACCGTCAAATTACGATGCCTTTCAAGAATACTACCTT
GAATTTGTAGATACCTTATCAAAAGGGCTAAGCTACAACAAAGACGCCAAGGTCTATGTG
GTTAATGGAGATACTCGTCAAGATATTACTAATTCATTTACAGTTAGTGAAGATGGTTCA
TCTTTTAAAATCAATAACCTAAAGGCTGTTTCAGGGAGTAACAATAACAGCTACCAGTAAG
ATCGTTGTGCAATACACTGCTACCCTCAATGACCAAGCGGCCATCGGCAAAAAAGGAAAT
CCAAACGAAGTTGCTTTGAAATACTCAAACGATCCAAACGCTCTTGAAAAAGGAGAGGAG
TCTCCAAAAGGGGAGACACCAAAAAGACAAGGTTATCGTTTTTCACCTATAAACTTCTAGA
TTATCTGGTCCGCCAGGATACCCACTTACTCGTGATTTCTCCCGTAACTTCCTAGAAGAA
AATACTGCAAAATATTTAGATCAATTAAGAGAACATCTACAGCACAGATTTAGTGAACCTT
GAGAGCTTAACAAGAAAATTAGAGAAAGAAGGCGGTACCCGAGGTCCACTGCAGGACCAG
CCAGCAGCACTAAAATATCCAGAACCTAGAGACTATTTTCTTCATACTCGTGAAGGTGAT
GTTATTTATGATGAGGATATAAAAAGATATTTTGAGGATTTAGAAGCCTATTTAACAGCT
AGACTTGGTGGGATTGATAAAAAAGTAGAAGAAGCTGCCCCAAAAGCCAGAGCTCTTAGAC
GCAGCAACAGTGTTAGAGCCTACAACAGCCTTCATTAGAGAAGCTGTTAGGGAAATCAAT
CAGCTGAGTGATGACTACGCTGACAATCAAGAGCTTCAGGCTGTTCTTGCTAATGCTGGA
GTTGAGGCACTTGCTGCAGATACTGTTGATCAGGCTAAAGCAGCTCTTGACAAAGCAAAG
GCAGCTGTTGCTGGTGTTTCAGCTTGATGAAGCAAGACGTGAGGCTTACAGAACAATCAAT

GCCTTAAGTGATCAGCACAAAAGCGATCAAAAGGTTGAGCTAGCTCTAGTTGCTGCAGCA
 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 usa otra estrategia de fusión.

LEVLFQ*GPLGSTNLSDNITSLTVASSSLRDGERTTVKVAFFDDKKQKIKAGDTIEVTWPTS
 GNVYIQGFNKTIPLNIRGVDVGTLEVTLDKAVFTFNQNIETMHDVSGWGEFDITVRNVTQ
 TTAETSGTTTVKVGNRATITVTKEAGTGTSSFYKTDGMDQPNTERVRWFLLINNKE
 WVANTVTVEDDIQGGQTLDMSSFDITVSGYRNERFVGENALTEFHTTTPNSVITATDNHI
 SVRLDQYDASQNTVNIAYKTKITDFDQKEFANNSKIWYQILYKDQVSGQESNHQVANINA
 NGGVDGSRYTSFTVK**EL**DTASYTITVEGATAGHTYEAYQIFKGDLEFDSTLSNITWGGGVT
 PFEFDGSKDAAKIAEGLKEANAAFAKEAGKHLTATIAGTGTHAITVNEAGYYLIKDKND
 SQTGKHDAYTSFVLKVVKNSTFKPKSAIPTVLKKVKDRNDKTGLETGWQDSADYDKNDKV
 PFQLTATLPSNYDAFQEYYLEFVDTLKGLSYNKDAKVYVNGDTRQDITNSFTVSEDGS
 SFKINNLKAVQGVITATSKIVVEYTATLNDQAAIGKKGNPNEVALKYSNPNALGKGEE
 SPKGETPKDKVIVFTYKT**SRL**SGPPGYPLTRDFSRNFLEENTAKYLDQLREHLQHRFSEL
 ESLTRKLEKEGGTRG**PLQ**DQPAALKYPEPRDYFLHTREGDVIYDEDIKRYFEDLEAYLTA
 RLGGIDKKVEEAAQKP**ELL**DAATVLEPTTAFIREAVREINQLSDDYADNQLQAVLANAG
 VEALAADTVDAQAKAALDKAKAAVAGVQLDEARREAYRTINALSDQHKSQKVQLALVAAA
 AKVADAASVDQVNAAINDAHTAIADITGAALLEAKEAAINELKQYGISDYVTLINKAK

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-glutación (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 Glutación-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 (las SEQ ID NO: 22, 24, 26, 28, 30, 32 y 34) contiene cinco aminoácidos N-terminales adicionales, Gly-Pro-Leu-Gly-Ser, que proceden 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 (las 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 proceden del vector.

Ejemplo 10. Formulación de vacunas Strangvacc para inmunizaciones de caballos

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

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 las Ref. 13 y 14.

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).

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).

Strangvacc 5.

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

Strangvacc 7.

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

Strangvacc 8.

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

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

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.

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.

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.

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

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.

En resumen, todos los procedimientos para la inmunización, la infección experimental y la evaluación clínica de los caballos fueron tal como se describe en PLoS Path, Guss *et al.* (2009), Ref. 14, y el documento 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, los niveles de los neutrófilos y del fibrinógeno y la respuesta de anticuerpos contra antígenos presentes en la vacuna respectiva. Después de la finalización de los estudios de vacunación/provocación, los caballos se sacrificaron y se realizaron exámenes *post mortem* (PM).

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	Strangvac 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.

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 la inmunización, la infección experimental y la evaluación clínica de los caballos fueron tal como se describe en PLoS Path, Guss *et al.* (2009).

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 las 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, definida 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 de 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 la pirexia corto en los 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.

Se determinaron las respuestas de anticuerpos en los ponis vacunados tal como se describe en PLoS Path, Guss *et al* (2009), Ref. 14. En resumen, se usó un ensayo ELISA convencional donde se diluyeron en series de dos veces muestras de suero. Se determinaron para cada muestra los valores logarítmicos de la dilución necesarios para dar un valor de absorbancia de 1,0. 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 una proteína de fusión dio como resultado que una proteína incluida se volviera no inmunógena, debido a un plegamiento o exposición al sistema inmunitario desfavorable.

La figura 3 muestra en cambio que la inmunogenicidad, en algunos casos, se potencia significativamente usando proteínas de fusión. El panel superior en la figura 3 muestra que los anticuerpos en los 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. En Strangvacc 2 y 3/4 CNE está 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 los ponis vacunados con proteínas de fusión que con Eq5 como proteína única.

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

Un fragmento génico del gen *eq54* se amplificó por PCR usando los pares de cebadores Eq54F y Eq54R. Después de la amplificación y la 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 génico de *eq54*

SEQ ID 35. Eq54F 5'-gcat**ccatgg**atacagcaagctatacca-3'

SEQ ID 36. Eq54R 3'-caattattttccagatag**ggagct**cagct-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.

CCATGGATACAGCAAGCTATACCATCACTGTTGAGGGAGCTACAGCAGGTCACACC
TATGAGGCTTATCAGATTTTCAAGGGTGACTTGTTTGACAGTACCCTATCAAACATCACA
TGGGGAGGTGGTGTACACCTTTGAATTTGATGGTTCAAAGACGCTGCTAAGATTGCA
GAGGGATTGAAGGAAGCAAATGCAGCTGCCTTTGCCAAGGAAGCAGGTAAGCACTTGACA
GCAACCATTCAGGAACAGGAACACATGCAATCACCGTTAACGAGGCTGGCTACTACCTC

ATCAAGGACAAAAATGATTCTCAAACAGGCAAGCATGACGCCTACACCTCATTGTCTCTG
 AAGGTTGTTAAAAACACCAGCTTCAAACCAAATCTGCTATCCCAACAGTCCTTAAAAAG
 GTCAAGGACCGTAATGACAAGACAGGTCTTGAGACAGGCTGGCAAGATTCAGCTGACTAT
 GACAAAAATGACAAGGTGCCATTCCAGCTAACCGCAACCCTACCGTCAAATTACGATGCC
 TTTCAAGAATACTACCTTGAATTTGTAGATACCTTATCAAAAGGGCTAAGCTACAACAAA
 GACGCCAAGGTCTATGTGGTTAATGGAGATACTCGTCAAGATATTACTAATTCATTTACA
 GTTAGTGAAGATGGTTCATCTTTTAAAATCAATAACCTAAAGGCTGTTTCAAGGAGTAACA
 ATAACAGCTACCAGTAAGATCGTTGTGGAATACACTGCTACCCTCAATGACCAAGCGGCC
 ATCGGCAAAAAAGGAAATCCAAACGAAGTTGCTTTGAAATACTCAAACGATCCAAACGCT
 CTTGGAAAAGGAGAGGAGTCTCCAAAAGGGGAGACACCAAAAGACAAGGTTATCGTTTTTC
 ACCTATAAACTATCATCAATAAGGTTGATCAAGATCAAAAAGCCCTAAAAGGTGCAGGC
 TTTACCCTTTATAAGCTGGTCAAAGGTGATAATGGCGAGGAAAAATATCAAATAGTCCAA
 GAAATTAAAGCAGGGGATACAACTAGCTTTGAGTTTGTGGACTTGACGCTGGTGATTAC
 AAGCTCAGCGAAACAACAACACCTGGCGGTTACAACACTATTGCAGATGTCATGTTTCAGC
 ATTGTAGCGCAGCATGAAACCGAGTCAGACGATCCTCAGTTGACTAGCCTAACCGTTGAC
 AAAGCAACTGGCTTCACTGCTGATACAGAAGCTGGTACCGTATCCGCAACTATTGTTAAT
 AAAAGGTCTATC**CTCGAGCCCGGGTGC**

- 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 Leu-Glu-Pro-Gly se originan en el vector.

MDTASYTITVEGATAGHTYEAYQIFKGDLEFSTLSNITWGGGVTPFEFDGSKDAAKIAEG
 LKEANAAFAKEAGKHLTATIAGTGTHAITVNEAGYYLIKDNDSQTGKHDAYTSFVLKV
 VKNTSFKPKSAIPTVLKKVKDRNDKTGLETGWQDSADYDKNDKVPFQLTATLPSNYDAFQ
 EYYLEFVDTLISKGLSYNKDAKVYVVGNDTRQDITNSFTVSEDGSSFKINNLLKAVQGVITIT
 ATSKIVVEYTATLNDQAAIGKKGNPNEVALKYSNPNALGKGEESPKGETPKDKVIVFTY
 KTIINKVDQDQKALKGAGFTLYKLVKGDNGEEKYQIVQEIKAGDTTSFEFVGLDAGDYKL
 SETTTPGGYNTIADVMFSIVAQHETESDDPQLTSLTVDKATGFTADTEAGTVSATIVNKR
SILEPG

- 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 la amplificación y la 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)

- 15 Tabla 5. Cebadores (5'-3') usados para clonar el fragmento génico de *eq27*.

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.

CCATGGAGAGTCTGACGAGTGTGAGCCTGCTGATGGTGCGGTCATGGTCAAGTCAGAGG
 CTGCTGACCAAGGCTCAAATGAGCTACCAGAAGCTACTGACATTAGTGATATTGCTGGTA
 TTTCTGATGTGACTAAGGTGTCAGCTGCTGTCAATGCTGATACTGTCAAGGAAGTTCAGC
 CAGTAGCTGTACCTCTTGTAGAGGATCAGGCGCATGAGGAACTACAGACCAGTCTCAGC
 CTTTCATCATCGATAGTGTCTGTTACGACAGACAGCTCTCTAGAGACACCAGAAGCTACAA
 GCTCAGAGGAGCCGATAGCGGAGCAGACCTTGCGGCTGCATTTCAAGACCCTGCCAGCTC
 AAGACCTATCCTCGCTTGGTCTTTGGGTGTGGGACGATGTTGAGACACCATCTGATCAGC
 TGGGAGGCTGGCCGACTGGGGCTACCAATTTTAGTCTAGCGAAGACAGATGACTATGGCT
 ATTACATGGACGTTAAGCTTTCAGCCAATCAAGCCAATAAGGTTAGCTTTTTGATCAATA
 AACTAAGGGAGACAATCTGACGGGCGATCGAACCATAGACCTTCTCAGCCCTAAGATGA
 ATGAGGTCTGGATTGATGGCCAGGAGCTGTCTTACTATCGGCCGCTGGCTCAGGGCTATA
 TCCGTATCAATTATTATCGCAGTGATGGCCATTATGACAACAAATCGCTCTGGCTTTGGG
 GAAGTGCTGATGCGTCAATGACTAGTCAGCAGGGCGCTTGCCAGATGGTATTGATTTTA
 AGCAGGTCGGTCGATATGGTGCTTATATAGATGTCAAGCTAGCTGATACCAATGAGCTAG
 GCTTCTCTTGCTAGATGAGCGTCAGACAGGTGACGCTGTAAAATTCAGCCCAATGATT
 ATATTTTTTAAAGATTTAAAGAATCACACCCAAATTTTCTTGAAAGACGAGGATCCAACCA
 TTTATACGAACCTTATTTTGTAAATACAGTTAGATTAATCGGTGCTCAGCAGGTGAGCC
 CAAGCAGTATTGAGGCGAGCTTTACGACTCTAGCAGATGTGGATAAGGAAAGCCTTTTAA
 AAGAATTAAAAATCAGCACTGACAGTAAGGAAGCAGTTGCTATTACTGATATCACCTTAG
 ATGAAAAGACTCATAAGGCTGTCATCACAGGTGATTTTAGTCAAGCAGTGGCCACTTATA
 CGGTGACCTTTCATCATGAGAGCTTCCAGGCTAGGCCAAATTGGCAATACAAGGATAGCC
 TGTATGCTTATGACGGTGAGCTAGGACTCGAGCCCGGGTGC

SEQ ID NO: 42. Fragmento de la 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 en el vector.

5

MESLTSVEPADGAVMVKSEAADQGSNELPEATDISDIAGISDVTKVSAAVNADTVKEVQP
 VAVPLVEDQAHEETTDQSQPSSSIVSVTTDSSLETPEATSSEEPIDAEQTLRLHFKTLPAQ
 DLSSLGLWVWDDVETPSDQLGGWPTGATNFSIAKTDDYGYMDVKLSANQANKVSFLINN
 TKGDNLTGDRTIDLLSPKMNEVWIDGQELSYRPLAQGYIRINYRSDGHYDNKSLWLWG
 SADASMTSQQGAWPDGIDFKQVGRYGAYIDVKLADTNELGFLLLDERQTGDAVKIQPNDY
 IFKDLKNHTQIFLKDEDPTIYTNPYFVNTVRLIGAQQVSPSSIEASFTTLADV D KESLLK
 ELKISTDSKEAVAITDITLDEKTHKAVITGDFSQAVATYTVTFHHESFQARPNWQYKDSL
 YAYDGELGLEPG

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

10 Ejemplo comparativo 17. Inmunización de ratones con Eq54 y Eq27

Se guardaron ratones (NMRI) que pesaban aproximadamente 23-25 g 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 comparativo 18. Infección experimental con *Streptococcus equi*

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 (THY) al 1 %. 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 µl se usó para todas las infecciones de ratones por *S. equi*. 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 comparativo 19. Resultados experimentales de vacunación con Eq54 o Eq27.

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.

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, reflejado por una pérdida de peso más moderada en comparación con los animales de control. Los animales que perdieron más del 20 % de 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.

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 estaban colonizados fuertemente con bacterias. Los ratones vacunados con Eq54 o Eq27 estaban significativamente ($p < 0,05$) menos colonizados en comparación con el grupo de control los días 2 y 3.

Ejemplo comparativo 20. Determinación de los niveles de anticuerpos en los 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 un ensayo inmonadsorbente ligado a enzimas (ELISA) convencional para determinar los niveles de IgG dirigida específicamente contra Eq54 y Eq27. En resumen, se revistieron placas de microvaloración 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 las muestras de suero a diluciones sucesivas, comenzando a una dilución de 40 veces (1 hora a 37 °C) seguido 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 convencional. 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.

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.

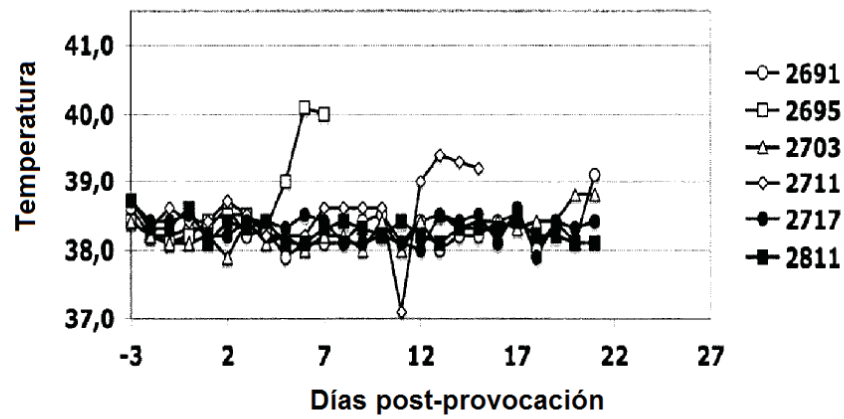
- 3.) Allhorn, M., Olin, A.I. Nimmerjahn, F. y Collin, M. PLoS ONE (www.plosone.org) enero de 2008. Número 1. e1413. Acceso libre.
- 4.) Allhorn, M., Olsén, A y Collin, M. BMC Microbiology 2008 8: 3. (<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/8/3>) Acceso libre.
- 5.) Barnham, M., A. Ljunggren, y M. McIntyre. 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): e1000584 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) Proteínas extracelulares de *Streptococcus equi* potencialmente relacionadas con la virulencia. (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) Caracterización de proteínas extracelulares de adhesión de *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.
- 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.
- 43.) Turner CE, *et al.* (2009) Vaccine. 6 de agosto; 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, Å., Lannergård, J., Bergman, R., Guss, B. y Flock, J.-I. (2007) Vaccine 25: 3629-3635.

REIVINDICACIONES

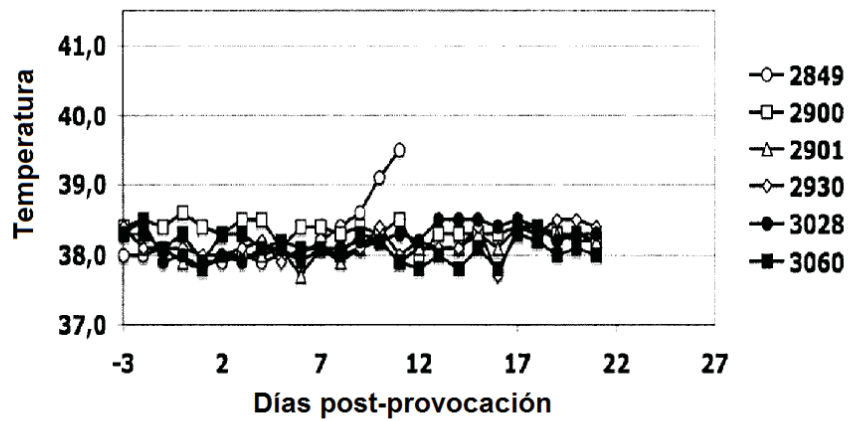
1. Una composición antigénica que comprende una pluralidad de componentes antigénicos procedentes de antígenos de *Streptococcus equi* subsp. *equi* o subsp. *zooepidemicus*, comprendiendo los componentes antigénicos:
 - (i) un primer polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 24 comenzando a partir del aminoácido 12;
 - (ii) un segundo polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 22 comenzando a partir del aminoácido 12; y
 - (iii) al menos parte de una proteína designada IdeE que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 26 comenzando a partir del aminoácido 12, en la que dicha al menos parte de dicha proteína comprende al menos un epítipo antigénico.
2. Una composición de vacuna para proteger a mamíferos no humanos contra la infección por *Streptococcus equi*, que comprende la composición antigénica de la reivindicación 1 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.
3. Una composición de vacuna para proteger a mamíferos no humanos contra la infección por *Streptococcus equi*, que comprende al menos un vector recombinante y polinucleótidos insertados en el mismo que codifican los componentes antigénicos de la composición de la reivindicación 1, vector o vectores que son capaces de expresar dichos componentes *in vivo* en un mamífero susceptible a la infección con *Streptococcus equi*, en la que el vector es preferentemente un vector de expresión en forma de un plásmido o de un vector vírico, y cuya composición se proporciona preferentemente en una forma fisiológicamente administrable, preferentemente una forma que es administrable por inoculación intramuscular, intradérmica, subcutánea o intranasal.
4. La composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en la que la vacuna es capaz de proteger a mamíferos susceptibles contra la infección por *Streptococcus equi*, especialmente a 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.
5. Un método para producir un antígeno de una composición antigénica de la reivindicación 1, método que comprende
 - (a) proporcionar fragmentos de ADN que codifiquen dichos antígenos e introducir dichos fragmentos en al menos un vector de expresión;
 - (b) introducir dicho al menos un vector, que contiene dichos fragmentos de ADN, en al menos una célula hospedadora compatible;
 - (c) cultivar dicha al menos una célula hospedadora proporcionada en la etapa (b) en las condiciones necesarias para la expresión de los productos codificados por dichos fragmentos de ADN; y
 - (d) aislar los productos expresados de cada célula hospedadora cultivada y, opcionalmente,
 - (e) purificar los productos aislados de la etapa (d), preferentemente mediante un método cromatográfico.
6. Una composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de infecciones causadas por *Streptococcus equi*.
7. Un método para la producción de un antisuero, método que comprende administrar una composición antigénica de acuerdo con la reivindicación 1 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)

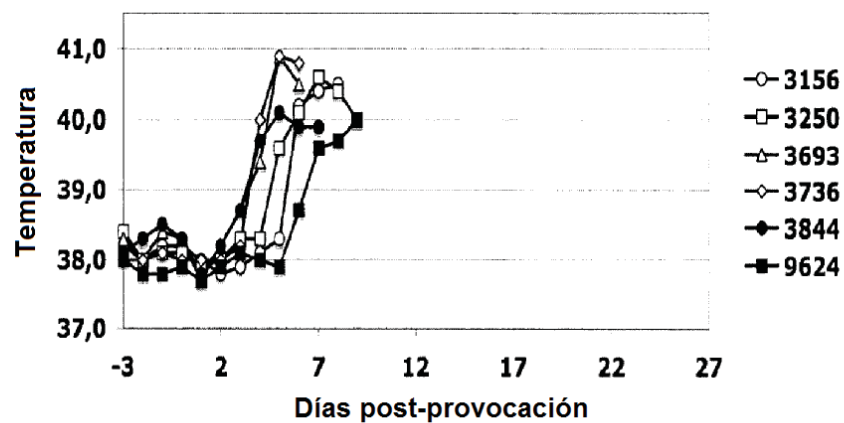


Figura 1B
(Paneles D, E y F)

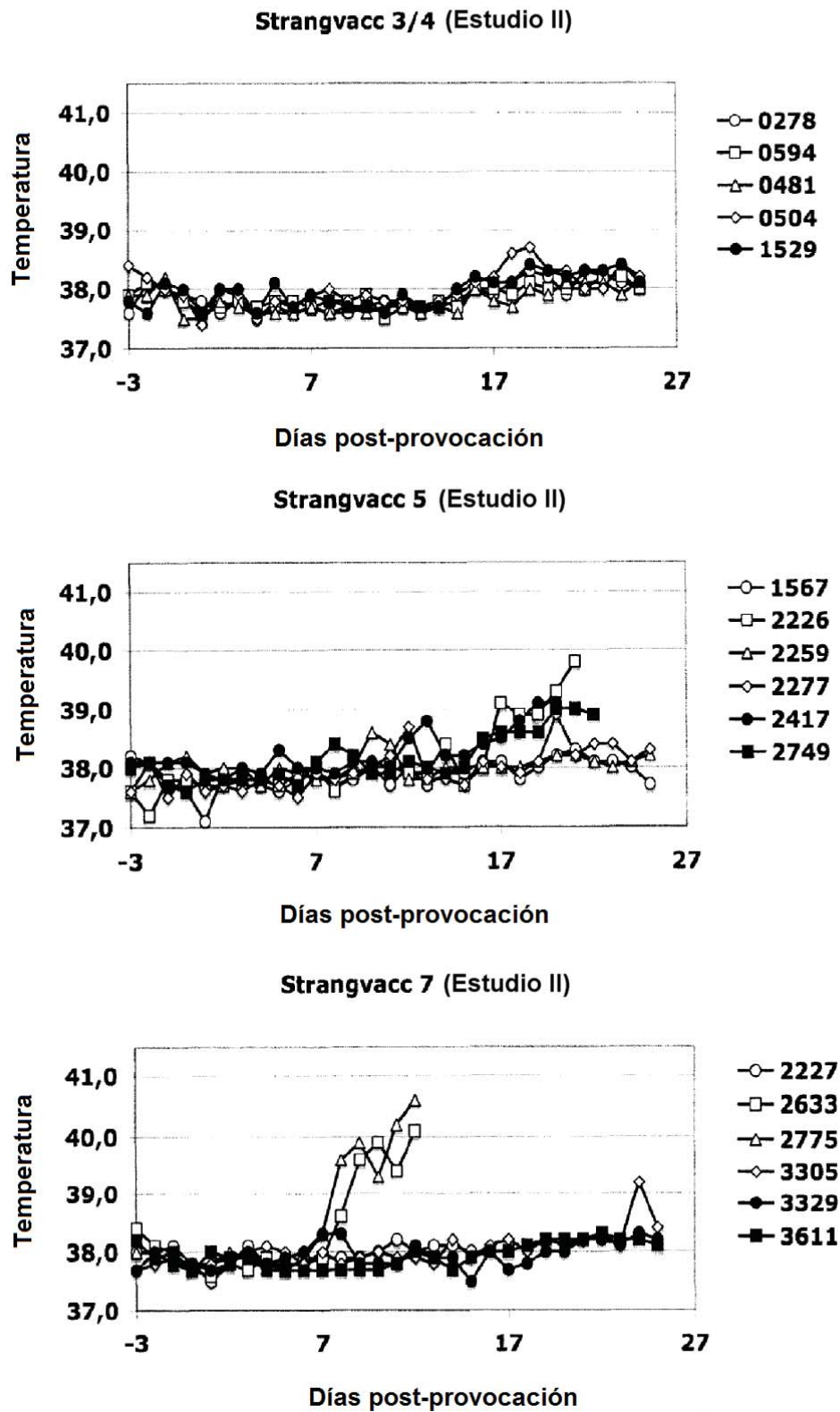


Figura 1C
(Paneles G y H)

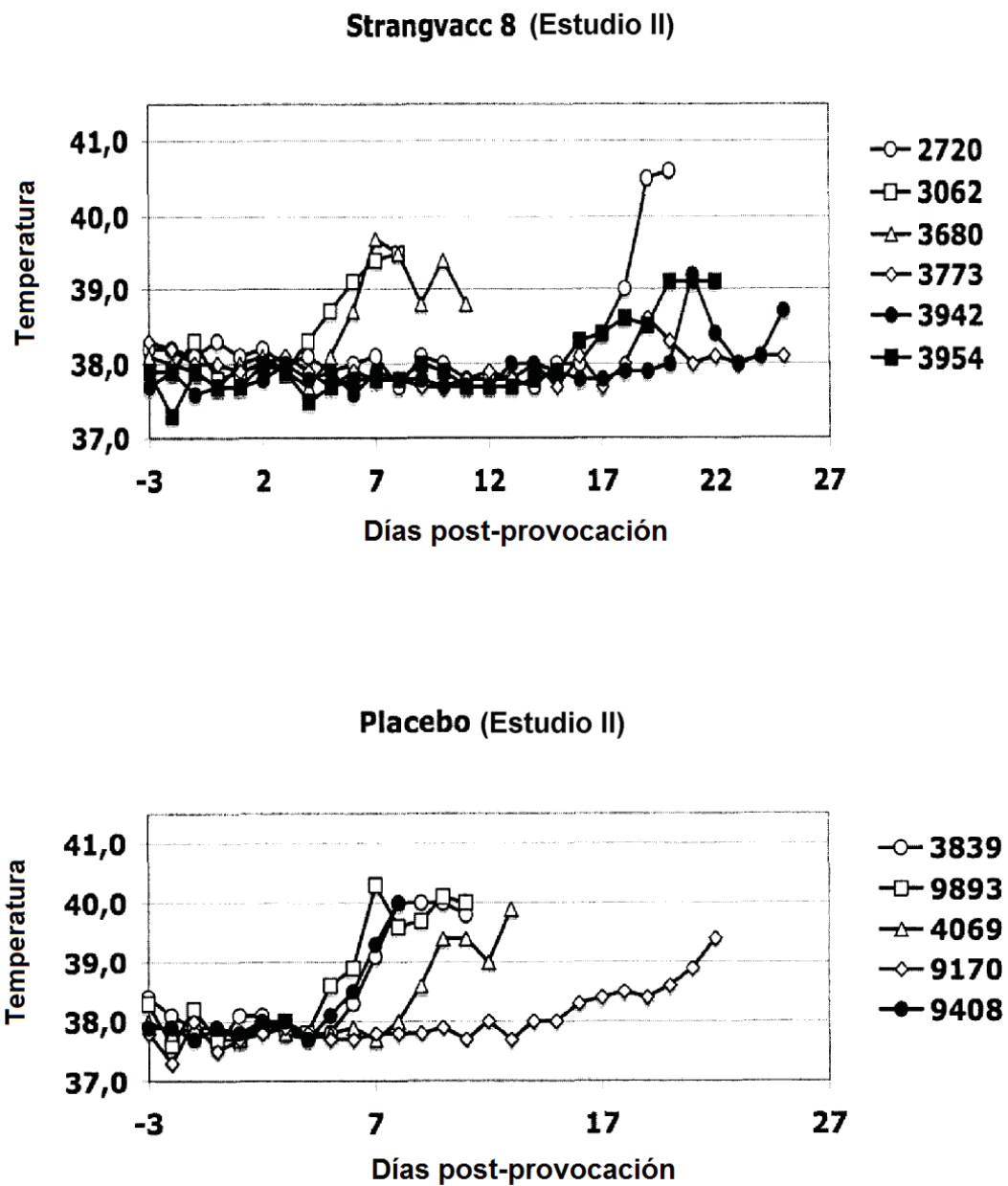


Figura 2

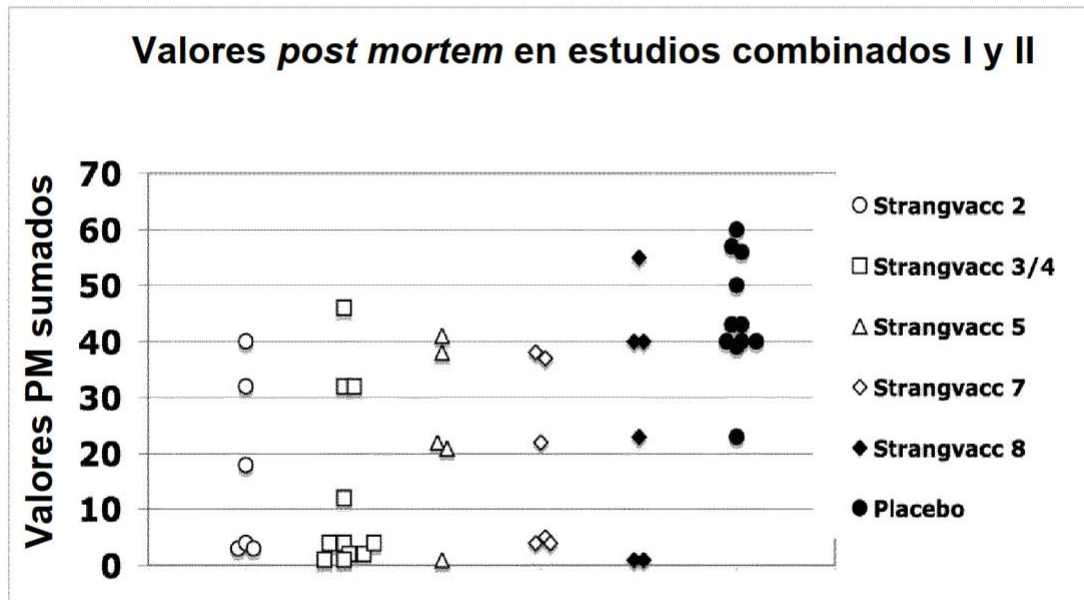


Figura 3

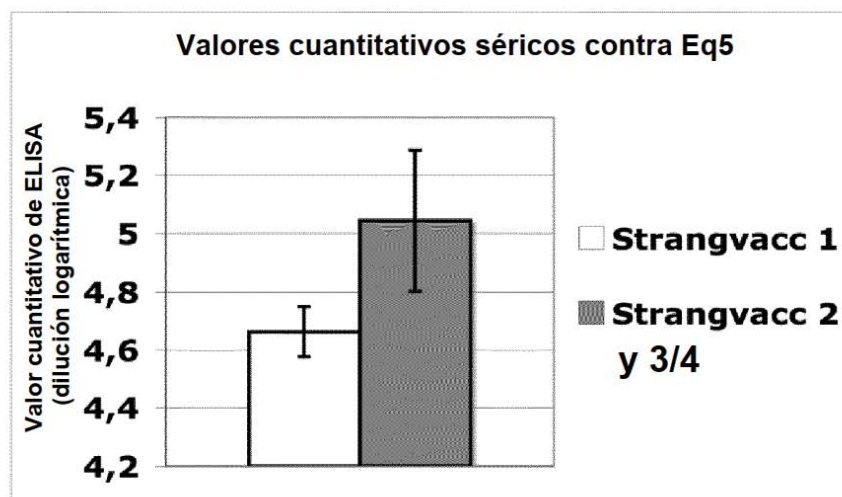
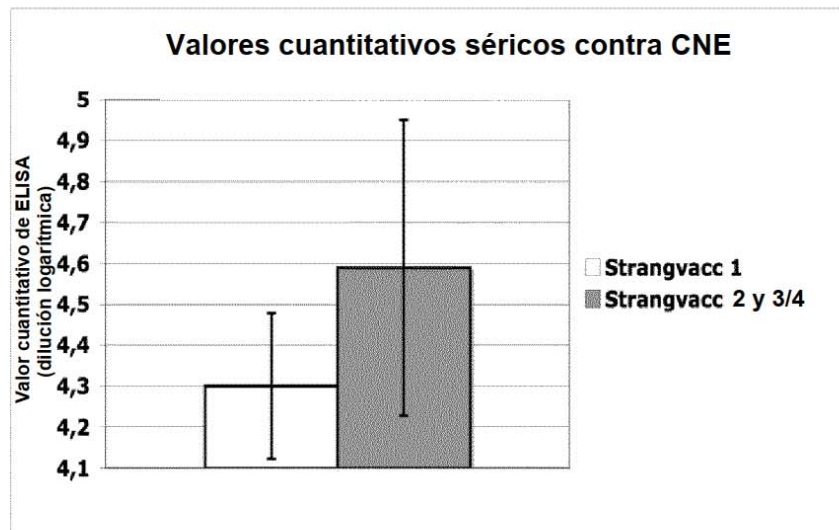


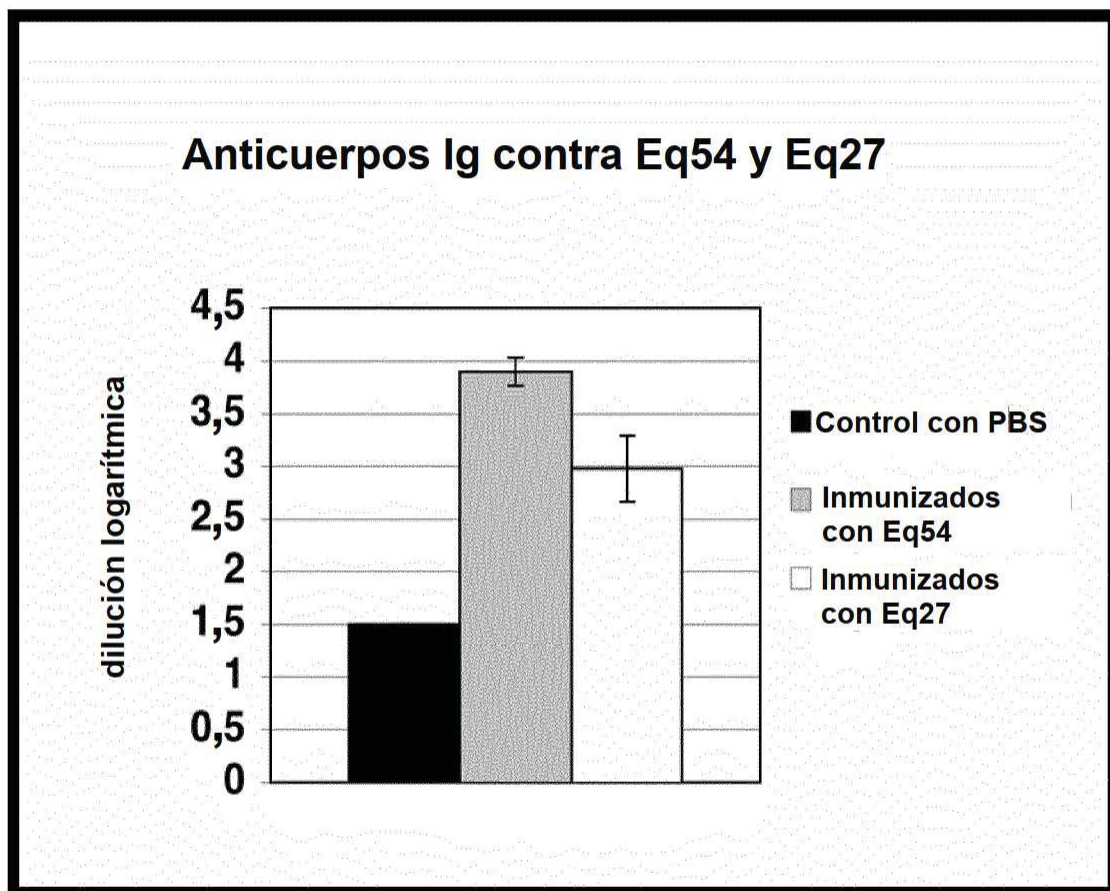
Figura 4A

Figura 4B

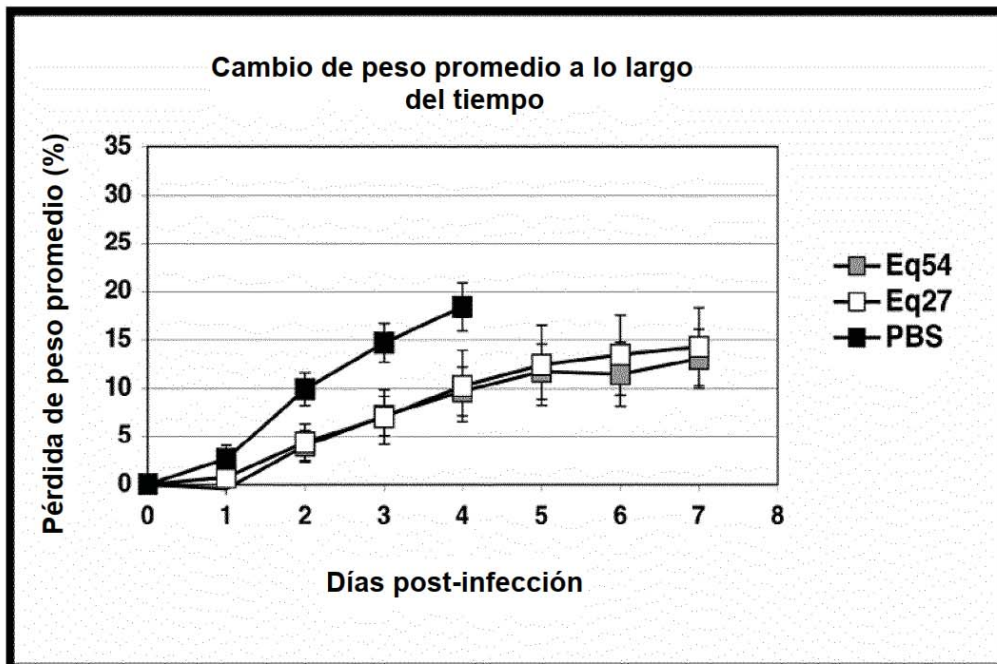


Figura 4C

