

COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE MEJORA DE RESPUESTAS INMUNITARIAS A *STREPTOCOCCUS*

INVENTOR(ES): Sheryll Layton y Jeffrey W. Hall

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con los campos de la microbiología y la vacunología y, específicamente, con el desarrollo de una vacuna capaz de conferir inmunidad contra la infección por *Streptococcus*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El género bacteriano *Streptococcus* es un grupo grande de cocos Gram positivos, que forman grandes cadenas de células. El género tiene un gran tamaño y diversidad, con muchos patógenos importantes, tanto humanos como agrícolas, que causan una amplia gama de enfermedades diferentes. El impacto a nivel mundial en la economía, la mortalidad y morbilidad de las infecciones estreptocócicas es significativo. Si bien se han desarrollado vacunas eficaces contra el *S. pneumoniae* (neumococo), sigue habiendo una gran necesidad de vacunas asequibles y eficaces contra otras especies de estreptococos que infectan tanto a seres humanos como a animales, como *S. suis* (patógeno porcino y zoonótico) y *S. agalactiae* (patógeno animal, humano e ictícola).

Al igual que con muchos géneros, la clasificación del género *Streptococcus* ha sufrido múltiples modificaciones. Existen muchos métodos de clasificación de estreptococos (Lancefield, hemólisis, metabolismo), pero el método principal y más completo para medir el grado de relación genética consiste en el uso de secuenciación de ADNr 16s, con taxonomistas que clasifican el género en 6 grupos principales que contienen al menos 75 especies distintas. Para complicar aun más la clasificación, y en

última instancia, una inmunización exitosa, es la plasticidad del genoma dentro del género, lo cual puede permitir a cepas individuales desarrollar nuevos rasgos que les permitan evadir una respuesta inmunitaria o aumentar su capacidad patógena. Con frecuencia, se hace referencia a cepas pertenecientes a una especie como un tipo de secuencia (ST) o serotipo para indicar sus rasgos genéticos o serológicos, respectivamente.

El polisacárido capsular (CPS) es una matriz celular extracelular, que rodea la célula bacteriana y está formado por unidades repetidas de oligosacáridos lineales o ramificados conectados por aminoácidos unidos a los grupos hidroxilo de los anillos de azúcares. El polisacárido capsular limita la capacidad del sistema inmunitario del huésped de englobar, destruir y erradicar las células bacterianas. En la mayoría de los estreptococos, el locus de polisacárido capsular se compone de ocho genes, que codifican la vía biosintética para la producción de polisacárido capsular. Durante décadas, el polisacárido capsular de los estreptococos y de otras bacterias patógenas ha sido el centro de atención de la investigación vacunológica por su alta capacidad inmunogénica, limitándose el éxito de ello al *S. pneumoniae*. Desafortunadamente, el polisacárido capsular es, además, altamente variable, debido a que el genoma de los estreptococos tiene una gran plasticidad, con altos niveles de recombinación genómica y conmutación génica. La recombinación dentro del locus de polisacárido capsular da lugar a otros serotipos dentro de la especie de estreptococo y dificulta en extremo el desarrollo de una vacuna de amplia eficacia contra una especie específica.

Además del polisacárido capsular, los estreptococos patógenos codifican una variedad increíblemente amplia de componentes asociados a la superficie o secretados en ella, genes reguladores o vías metabólicas, que en su conjunto estimulan la capacidad de colonizar un huésped y evadir el sistema inmunitario. Por ejemplo, existen al menos

100 factores conocidos o putativos dentro del pangenoma de *S. suis*, que confieren capacidades patógenas, pero debido a la plasticidad del genoma y su recombinación, no se distribuyen de manera homogénea en la especie, lo que lleva a idear estrategias de vacunación ineficaces. Una de estas estrategias de vacunación ineficaces consiste en centrarse en rasgos, serogrupos o tipos de secuencia individuales.

El surgimiento de la secuenciación genómica de alto rendimiento ha revolucionado la capacidad de los científicos de clasificar y organizar especies, y lo que es más importante, ha permitido a los científicos definir genomas centrales y pangenomas de bacterias, genes esenciales descubiertos en todas las especies de géneros y genes móviles descubiertos en ciertos linajes de una especie, respectivamente. A través del análisis y la comparación de genomas centrales de estreptococos, es posible identificar genes esenciales altamente conservados, que contienen epítopes potencialmente antigénicos e inmunológicamente protectores en todas las especies. Estos antígenos tienen el potencial de ofrecer una mayor eficacia, debido a que entrenan al sistema inmunitario de un huésped a atacar a una o más proteínas esenciales para el desarrollo y la replicación de la célula bacteriana y se conservan en todos los estreptococos, lo que confiere a todas las especies una protección amplia.

Así, existe una clara necesidad de una vacuna contra estreptococo que ofrezca una protección amplia, que sea antigénica e inmunogénica en cerdos domésticos híbridos de uso comercial, y que proteja a la tilapia del Nilo contra infecciones con *S. agalactiae*.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención incluye una vacuna contra estreptococo que ofrece una protección amplia, y que es antigénica e inmunogénica.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 ilustra ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), que permiten detectar anticuerpos de epítipo anti-Strep en: A) IgA de secreción en saliva el día 34 del estudio, B) IgA de secreción en mucosa intestinal el día 35 del estudio, C) IgG en suero el día 34 del estudio. Los datos se agruparon por vía de vacunación. Todos los datos son relativos a animales de control no tratados que recibieron solución salina. Las relaciones mayores que 1 indican niveles de anticuerpo mayores que los animales de control que recibieron solución salina.

La figura 2 ilustra un análisis de supervivencia Kaplan-Meier de tilapia del Nilo provocado con virulencia de *S. agalactiae*. Los grupos que recibieron IP-AV (control positivo) y alimentados por inmersión con SV1 al 10 % y por administración oral al 1 % tuvieron una supervivencia significativamente mayor que los controles no vacunados ($p < 0,05$).

La figura 3 ilustra el esquema de evaluación.

La figura 4 ilustra la relación S/P de sIgA correspondiente a saliva de cerdos vacunados con SV1.

La figura 5 ilustra la relación S/P de IgG correspondiente a suero de cerdos vacunados con SV1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A partir de este momento, la presente invención se describirá en mayor profundidad en la siguiente descripción detallada de la invención, en la cual se describen algunas de las modalidades de la invención, pero no todas. De hecho, esta invención se puede poner en práctica de muchas formas diferentes y no se debe interpretar como

limitada a las modalidades establecidas en ella; más bien, estas modalidades se disponen para que esta divulgación cumpla los requisitos legales correspondientes.

La terminología del presente documento tiene como fin describir modalidades específicas y no limitar la invención. En el presente documento, el término "y/o" incluye todas y cada una de las combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados. En el presente documento, las formas singulares "un/una" y "el/la" incluyen tanto las formas plurales como las singulares, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, se sobrentiende que, en esta memoria descriptiva, los términos "comprende" y/o "que comprende(n)" especifican la presencia de las características, etapas, operaciones, elementos y/o componentes mencionados, pero no excluyen la presencia ni la adición de una o más características, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos suyos adicionales.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que usualmente entiende una persona común versada en el arte al que pertenece esta invención. Además, se sobrentiende que términos tales como los definidos en diccionarios de uso frecuente se deben interpretar como poseedores de un significado congruente con su significado en el contexto del arte pertinente y la presente divulgación y no se les debe dar una interpretación idealizada ni exageradamente formal, a menos que reciban expresamente tal definición en el presente documento.

Al describirse la invención, se sobrentiende que se divulga una serie de técnicas y etapas, cada una de las cuales tiene un beneficio individual, y cada una de las cuales se puede utilizar, además, en conjunto con una o más de las otras técnicas divulgadas y, en algunos casos, con todas ellas. Asimismo, para mayor claridad, en esta descripción, se evitará repetir innecesariamente cada combinación posible de las etapas individuales. No

obstante, la memoria descriptiva y las reivindicaciones se deben leer teniéndose en cuenta que estas combinaciones se encuentran completamente en el ámbito de la invención y las reivindicaciones.

El género *Streptococcus* es un género de cocos, o bacterias esféricas, gram positivos pertenecientes a la familia *Streptococcaceae* incluida en el orden *Lactobacillales* (bacterias de ácido láctico) del filo *Firmicutes*. Además de la faringitis estreptocócica, algunas especies de *Streptococcus* son responsables de muchos casos de conjuntivitis, meningitis, neumonía bacteriana, endocarditis, erisipelas y fascitis necrosante (infecciones bacterianas “comecarne”). Sin embargo, muchas especies estreptocócicas no son patógenas y forman parte de la microbiota humana comensal de la boca, la piel, el intestino y las vías respiratorias superiores.

La presente invención permitió identificar un epítipo de *Streptococcus*, el cual formaba parte de un antígeno protector. Un epítipo, también conocido como “determinante antigénico”, es la parte de un antígeno que es reconocida por el sistema inmunitario, específicamente por anticuerpos, linfocitos B o linfocitos T. La parte de un anticuerpo que se une al epítipo se denomina “parátipo”. Aunque, comúnmente, los epítipos son proteínas no propias, también corresponden a epítipos algunas secuencias derivadas del huésped, que se pueden reconocer (como en el caso de enfermedades autoinmunitarias).

Los epítipos de antígenos proteicos se dividen en dos categorías: epítipos conformacionales y epítipos lineales, de acuerdo con su estructura e interacción con el parátipo. Los epítipos conformacionales y lineales interactúan con el parátipo de acuerdo con la conformación tridimensional adoptada por el epítipo y determinada por las características superficiales de los residuos de epítipo involucrados y la forma o estructura terciaria de los demás segmentos del antígeno.

- La conformación tridimensional adoptada gracias a la interacción de residuos de aminoácidos no contiguos da forma al epítoto conformacional.
- En cambio, la conformación tridimensional adoptada gracias a la interacción de residuos de aminoácidos contiguos da forma al epítoto lineal.
 - Un epítoto lineal no se determina exclusivamente mediante la estructura primaria de los aminoácidos involucrados. Los residuos a los lados de los residuos de aminoácidos, así como también los residuos de aminoácidos más distantes, del antígeno influyen en la capacidad de los residuos de estructura primaria de adoptar la conformación tridimensional del epítoto.
 - El 90 % de los epítotos son conformacionales.

Un epítoto de linfocito T es un fragmento pequeño de un antígeno reconocido por un receptor de linfocito T (TCR). Los linfocitos T son un tipo de glóbulos blancos que cumplen una importante función en una respuesta inmunitaria adaptiva. Reconocen a invasores extraños, como bacterias y virus, y responden ante ellos. Comúnmente, los epítotos de linfocitos T tienen una longitud de 8 a 11 aminoácidos y se derivan de proteínas. Se presentan ante linfocitos T en la superficie de células presentadoras de antígenos (APC), que son células que absorbieron antígenos extraños y los procesaron para convertirlos en péptidos. Luego, los péptidos se unen a moléculas de MHC, las cuales se muestran en la superficie de las células presentadoras de antígenos.

Cuando un receptor de linfocito T se une a un epítoto de linfocito T, activa una serie de sucesos que producen la activación del linfocito T. Luego, los linfocitos T activados liberan citocinas, las cuales ayudan a reclutar otras células inmunitarias en el sitio de infección. También pueden eliminar células infectadas directamente. La capacidad de un linfocito T de reconocer un epítoto de linfocito T es determinada por la estructura del receptor de linfocito T. Cada receptor de linfocito T tiene un sitio de unión único

específico para un conjunto particular de epítopes de linfocitos T. El sitio de unión se forma por una combinación de aminoácidos en la molécula del receptor de linfocito T.

Un epítope de linfocito B es una pequeña parte de un antígeno reconocido por un receptor de linfocito B (BCR). Los linfocitos B son un tipo de glóbulos blancos que produce anticuerpos, que son proteínas que se unen a antígenos y ayudan a neutralizarlos. Comúnmente, los epítopes de linfocitos B tienen una longitud de 7 a 11 aminoácidos y se derivan de proteínas. Estos pueden ser lineales o conformacionales. Los epítopes lineales son secuencias cortas de aminoácidos que el receptor de linfocito B reconoce independientemente de la estructura tridimensional del antígeno. Los epítopes conformacionales son estructuras tridimensionales que el receptor de linfocito B reconoce. La capacidad de un linfocito B de reconocer un epítope de linfocito B en particular es determinada por la estructura del receptor de linfocito B. Cada receptor de linfocito B tiene un sitio de unión único específico para un conjunto particular de epítopes de linfocitos B. El sitio de unión se forma por una combinación de aminoácidos en la molécula del receptor de linfocito B.

Los epítopes de linfocitos T y los epítopes de linfocitos B son fragmentos pequeños de un antígeno reconocido por linfocitos T y linfocitos B, respectivamente, cada uno de los cuales es importante para la comprensión de la respuesta inmunitaria y para el desarrollo de nuevas vacunas y terapias. Las vacunas a base de epítopes estimulan las respuestas inmunitarias humorales y celulares mediante el uso de epítopes de linfocitos B o de linfocitos T aislados. En estas vacunas, se puede usar múltiples epítopes para aumentar su eficacia. Para encontrar epítopes que se puedan usar en la vacuna, a menudo se utiliza mapeo computacional. Una vez descubiertos epítopes candidatos, los constructos se diseñan mediante ingeniería genética, y se prueba su eficacia como vacuna.

Se utiliza una optimización de codones de nucleótidos para *Bacillus subtilis* a fin de derivar la secuencia de nucleótidos necesaria para la secuencia de ADN, y se fabricó una secuencia de ADN sintética recombinante (Genscript Biotech Corporation - Piscataway NJ, EE. UU.). La bacteria *Bacillus subtilis* es una bacteria no patógena inocua, cuya genética se puede modificar fácilmente y que se puede producir a gran escala. La bacteria *Bacillus subtilis* se ha utilizado para desarrollar vacunas contra una variedad de enfermedades, como ántrax, cólera y tuberculosis. Una de las ventajas de la bacteria *Bacillus subtilis* como vector de vacuna es que se puede administrar por vía oral, intranasal y parenteral, lo cual es una ventaja considerable con respecto a vacunas tradicionales, las cuales comúnmente, se administran solo mediante inyección. Otra ventaja del uso de *Bacillus subtilis* como vector de vacuna consiste en que se puede producir fácilmente a gran escala, lo que es importante para el desarrollo de vacunas contra nuevas enfermedades, ya que ellas pueden exigir la producción de grandes cantidades de vacuna en poco tiempo.

La secuencia de ADN sintética recombinante, completa con los sitios de restricción homólogos, se amplificó mediante el uso de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) tradicional con cebadores de secuencia específica, lo que produce un producto de amplificación. El producto de amplificación se purificó mediante técnicas de extracción con gel, se concentró, se digirió con BamHI y XbaI durante la noche y se volvió a purificar. BamHI es una enzima de restricción aislada a partir de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*. Es una endonucleasa de restricción tipo II, la cual reconoce una secuencia específica de ADN y corta el ADN dentro de dicha secuencia. La enzima BamHI reconoce la secuencia GGATCC y corta el ADN entre las bases G y A, dando lugar a dos fragmentos de ADN, cada uno de los cuales con un extremo cohesivo. Los extremos cohesivos son complementarios entre sí para poder ligarse (unirse). BamHI es una enzima de restricción muy versátil, ya que puede cortar ADN de una variedad de

fuentes, como bacterias, virus y plantas. También es fácil de usar y es económica, lo que la convierte en una alternativa asequible. XbaI es una enzima de restricción aislada a partir de la bacteria *Xanthomonas badrii*. Es una endonucleasa de restricción tipo II, la cual reconoce una secuencia específica de ADN y corta el ADN dentro de dicha secuencia. La enzima XbaI reconoce la secuencia T^ACTAGA y corta el ADN entre las bases T y A. XbaI es una enzima de restricción muy versátil, ya que puede cortar ADN de una variedad de fuentes, como bacterias, virus y plantas. Al igual que la enzima BamHI, también es fácil de usar y es económica, lo que la convierte en una alternativa asequible.

El plásmido de expresión de *Bacillus* pHT10 se digirió con enzimas BamHI y XbaI, se purificó, concentró y trató con rSAP. Luego, el inserto sintético digerido y el plásmido se mezclaron en una reacción de ADN ligasa T4 durante la noche a temperatura ambiente. La ADN ligasa T4 es una enzima que une dos trozos de ADN mediante la catálisis de la formación de un enlace de fosfodiéster entre el grupo 5'-fosfato de una cadena de ADN y el grupo 3'-hidroxilo de la otra cadena de ADN. Esta reacción es esencial para la replicación, reparación y recombinación del ADN.

La reacción de ADN ligasa T4 se desarrolla en las siguientes etapas:

1. La enzima ADN ligasa T4 se une a las dos cadenas de ADN que se unirán.
2. La enzima rompe los enlaces de fosfodiéster entre el grupo 5'-fosfato de una cadena de ADN y el grupo 3'-hidroxilo de la otra cadena de ADN.
3. Luego, la enzima vuelve a crear los enlaces de fosfodiéster entre las dos cadenas de ADN para unir las.
4. La enzima ADN ligasa T4 libera las dos cadenas de ADN, las cuales en ese momento, se unen.

La reacción de enlace se transformó en la cepa de *E. coli* DH5α (New England Biolabs - Ipswich, Massachusetts, EE. UU.), y se seleccionaron transformantes para el inserto génico en agar LB con ampicilina (100 µg/mL, LBamp). La reacción de enlace es un proceso que permite unir dos trozos de ADN. Luego, la molécula de ADN resultante se transforma en células de *E. coli* DH5α. Posteriormente, las células se hacen proliferar en una placa con un antibiótico que elimina toda célula que no contenga el gen clonado. Luego, las células que sobreviven se cultivan, y se recolecta el gen clonado.

El nuevo plásmido, pStrep, se purificó a partir de *E. coli* y se transformó en *B. subtilis*. Los transformantes se seleccionaron en agar trípico de soja con cloranfenicol (5 µg/mL, TSA^{Cm}), lo que permite crear la vacuna estreptocócica 1 (SV1) con la cepa de *Bacillus subtilis* recombinante.

Luego, se produce una subunidad protectora durante una fermentación de SV1 a entre 28 y 37 °C e inducción con β-D-1-tiogalactopiranosido isopropílico (IPTG) a una concentración que va de 0,1 a 0,5 mM. El cultivo se inactivó con formalina. Para producir la vacuna de prueba y sus iteraciones, el cultivo inactivado de SV1 se mezcló con un polisacárido natural, metilcelulosa (medio de encapsulación), que actúa como vehículo y protector del antígeno.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Estudio de inmunogenicidad de epítipo estreptocócico en cerdos destetados:

Título: Estudio piloto de determinación de la respuesta inmunitaria humoral en lechones de tres semanas después de una vacunación a través de distintas vías con una vacuna experimental estreptocócica.

Justificación: Las enfermedades causadas por *Streptococcus suis* y otras asociadas a estreptococos representan una carga sanitaria y económica considerable en operaciones intensivas de estabulación de cerdos. Las enfermedades asociadas con infecciones estreptocócicas incluyen meningitis, septicemia, artritis, poliserositis, endocarditis valvular, miocarditis, pericarditis y aborto. En la actualidad, la bacteria *Streptococcus suis* es la causa más frecuente de meningitis en cerdos enviada a laboratorios de diagnóstico veterinario. Las vacunas disponibles en la actualidad no logran provocar una protección cruzada adecuada entre muchos serotipos de *S. suis*, por lo que es necesaria una vacuna que provoque una potente respuesta inmunitaria protectora y con reactividad de serotipo cruzada.

Materiales y métodos: Se destetará a treinta cerdos a las 3 semanas de edad de una granja de altos estándares sanitarios, sin problemas históricos de *S. suis* ni otros factores de confusión mórbida (PRRS, *Mycoplasma hyopneumoniae*, PEDv, APP, etc.). Los cerdos se etiquetarán, pesarán y asignarán en forma aleatoria a uno de 10 grupos (2 duplicados x 5 grupos (3 cerdos/grupo)) y se dejarán aclimatar durante 2 a 3 días. El día 0 del estudio, se extraerán muestras de suero de cada cerdo, y se administrará la primera dosis de vacuna o solución salina, como se indica en la tabla 1. La segunda dosis se administra 14 días después, como se indica en la tabla 1. Los grupos de tratamiento se separan.

Vacunación: La vacuna se administrará en 2 dosis de 2 mL cada una, ya sea vía inyección intramuscular (IM) detrás de la oreja en el cuello, alimentación forzada o aerosol nasal (1 mL/fosa nasal). La administración de solución salina se realizará mediante alimentación forzada.

En la tabla 2, se describe el cronograma del estudio y las muestras que se extraerán.

Tabla 1: Vía de administración de la vacuna

N.º de animales (reps.)	Grupo	Dosis (día del estudio)	IM	Oral	Nasal	Solución salina oral
3 (2)	1 y 6	1ª (D0)	X			
		2ª (D14)	X			
3 (2)	2 y 7	1ª (D0)		X		
		2ª (D14)		X		
3 (2)	3 y 8	1ª (D0)			X	
		2ª (D14)			X	
3 (2)	4 y 9	1ª (D0)	X			
		2ª (D14)		X		
3 (2)	5 y 10	1ª (D0)				X
		2ª (D14)				X

Tabla 2: Cronograma del estudio y extracción de muestras

Día del estudio	Actividad
Día -3	Los cerdos se destetan, etiquetan y pesan, se asignan en forma aleatoria a grupos y se vacunan contra PCV2.
Día 0	Se extrajeron muestras de suero de todos los cerdos antes de la 1ª dosis de tratamiento. Los cerdos recibieron la primera dosis de tratamiento respectivo según la tabla 1. Se anotaron observaciones clínicas.
Día 14	Se extrajeron muestras de suero de todos los cerdos antes de la 2ª dosis de tratamiento. Los cerdos recibieron la segunda dosis de tratamiento respectivo según la tabla 1. Se anotaron observaciones clínicas.

Día 34	Extracción de fluidos orales de animales: extracción individual, si es posible, o por cuerda de corral - Muestras de suero extraídas de cada cerdo.
Día 35	Se anotaron observaciones clínicas. Los cerdos se pesaron. Muestras extraídas en necropsia: - Lavado de intestino delgado para determinar la presencia de sIgA mucosa.

Los resultados se ilustran en la figura 1, en la cual los ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) permiten detectar anticuerpos de epítipo anti-Strep en: A) IgA de secreción en saliva el día 34 del estudio, B) IgA de secreción en mucosa intestinal el día 35 del estudio, C) IgG en suero el día 34 del estudio. Los datos se agruparon por vía de vacunación. Todos los datos son relativos a animales de control no tratados que recibieron solución salina. Las relaciones mayores que 1 indican niveles de anticuerpo mayores que los animales de control que recibieron solución salina.

Ejemplo 2: Supervivencia de la tilapia del Nilo después de la vacunación con SV1 y provocación con *Streptococcus agalactiae* virulento

Diseño experimental, extracción de muestras y vacunación: Durante dos días, se aclimató un total de 180 alevines, que se distribuyeron en cuatro tratamientos, todos en triplicado (3 tanques/tratamiento, 15 peces/tanque). Los peces juveniles se distribuyeron en 12 unidades experimentales de 80 L, con un total de 15 peces por tanque. A los peces se les administró tratamientos según la siguiente descripción (tabla 1), y se dejaron crecer durante 54 días.

Los peces se vacunaron con SV1 vía inmersión (imer) y oral (oral) a través de un recubrimiento de los pelets de alimento. Actualmente, solo existen vacunas inyectables interparenterales comerciales, que permiten prevenir la estreptococosis, por lo que se usa una vacuna comercial de *S. agalactiae* (AquaVac) como tratamiento de control positivo (tabla 3).

Tabla 3: Grupos de tratamiento, vías de administración y número de duplicados por tratamiento

Tratamientos	Provocación	Vía de administración	Duplicados
			(15 peces/tanque)
T1. IP-AP	Sí	Inyección intraperitoneal (IP) de AquaVac	3
T2. Inmersión al 10 %	Sí	2 baños (día 0 y día 45 del estudio)	3
T3. Oral al 10 %	Sí	Oral (administrado los días 30/31 y 45/46)	3
T4. Control	Sí	Sin tratamiento	3

Intraperitoneal

La aplicación intraperitoneal de las vacunas se llevó a cabo el día 41 del experimento, 14 días antes de la provocación de la infección. Se administró una vacuna comercial, AQUAVAC® Strep SA, MSD, según las instrucciones de la etiqueta en el grupo de control positivo. La vacuna comercial (AV) se administró a 50 µL por pez.

Inmersión

En la aplicación por inmersión, los baños se realizaron dos días distintos del experimento. El primer baño se realizó al inicio del experimento (día cero), y el segundo baño, a los 45 días (d 45) del experimento. Se utilizó una dosis de 500 mL del compuesto SV1 en 4,5 L (10 % v/v), en la cual se sumergieron los peces durante 20 minutos.

Oral

En la vía oral, el compuesto SV1 se mezcló directamente en el pienso. Los peces recibieron el pienso con SV1 durante dos días consecutivos, en dos momentos diferentes durante el período. La primera ración con SV1 se ofreció los días 30 y 31, y la segunda, los días 45 y 46 del experimento. La inclusión de SV1 en la dieta se realizó 30 minutos antes de la administración de alimento. La dosis se definió en 100 μ L de vacuna por gramo de pienso (10 % v/p).

Provocación experimental: El día 55 del experimento, peces de todos los grupos fueron provocados con la cepa del patógeno bacteriano *S. agalactiae* S13 (ST-552, tipo 1b) aislada de un brote de estreptococosis en tilapia del Nilo en el estado brasileño de Paraná (Facimoto et al., 2017).

Inicialmente, se realizó un experimento con dosis letal al 50 % para determinar la concentración de bacterias capaces de eliminar el 50 % de la población no vacunada o provocada (LD_{50}). Para este ensayo de dosificación, se distribuyeron 40 tilapias del Nilo en 8 unidades experimentales de 30 L, con ventilación y temperatura controlada, con un total de cinco animales por unidad experimental. La etapa de LD_{50} se realizó en duplicado, y las concentraciones de bacterias probadas fueron: 1×10^5 ; 1×10^6 ; 1×10^7 ; 1×10^8 CFU mL^{-1} (no se muestran los datos). La etapa de LD_{50} de la cepa de *S. agalactiae* S13 administrada mediante inyección intraperitoneal se determinó en $\times 10^7$ CFU mL^{-1} , y esta

concentración se utilizó en el período posterior de vacunación y provocación descrito a continuación.

Los peces se alimentaron durante 54 días hasta que alcanzaron el peso aproximado de 50 g, peso en el cual los animales son más susceptibles a sufrir enfermedades (Mian et al., 2009). Transcurrido el período de engorda, cada pez fue provocado con 1×10^7 CFU mL⁻¹ de *S. agalactiae* S13 administrada mediante inyección intraperitoneal. Las bacterias se peletizaron y lavaron 3 veces en solución salina con buffer de fosfato (PBS) fría y estéril antes de inyectarse. Para realizar el procedimiento, los peces se sometieron a un procedimiento anestésico con eugenol.

Diariamente, se observaron signos clínicos durante los 7 días posteriores a la provocación, y diariamente, se retiraron todos los peces muertos de los tanques y se anotaron en el archivo del ensayo. Todos los peces que no se pudieron mantener sumergidos o mantener una orientación correcta fueron eutanasiados.

Resultados:

Tabla 4: Parámetros de crecimiento (media $\pm$ desviación estándar) de la tilapia del Nilo después de 54 días de experimento. Diferentes letras indican una diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0,05$)

	Inmersión al 10 %	IP-AV	Oral al 10 %	Control
Peso (g)	58,62 $\pm$ 12,48ab	59,31 $\pm$ 9,78ab	62,17 $\pm$ 11,08a	43,10 $\pm$ 0,10c
Longitud (cm)	14,39 $\pm$ 1,13b	14,41 $\pm$ 0,41b	15,13 $\pm$ 0,84a	12,94 $\pm$ 0,16

Análisis de supervivencia de la tilapia del Nilo provocada con *S. agalactiae* virulento:

Los resultados se ilustran en la figura 2, en la cual se muestra un análisis de supervivencia Kaplan-Meier de tilapia del Nilo provocado con *S. agalactiae* virulento. Los grupos que recibieron IP-AV (control positivo) y alimentados por inmersión con SV1 al 10 % y por administración oral al 10% tuvieron una supervivencia significativamente mayor que los controles no vacunados ($p < 0,05$).

Ejemplo 3: Determinación del volumen de la dosis, vía de administración y cinética de la respuesta inmunitaria humoral en cerdos vacunados con la vacuna experimental estreptocócica 1 (SV1)

Objetivo

Evaluar la respuesta inmunitaria humoral en cerdos vacunados con la formulación de vacuna experimental estreptocócica con diferentes volúmenes de dosis y vías de administración para determinar la presentación de vacuna óptima a nivel de anticuerpos específicos determinado mediante pruebas de inmunoensayo de antígeno específico.

Material y método

Animales y alojamiento

“Las Chirus” es una granja cercada de cerdos de ciclo completo, que cuenta con 450 criaderos, los cuales generan 20 entregas a la semana. Se encuentra en French, distrito de 9 de Julio, en la provincia de Buenos Aires, República de Argentina.

Durante el parto y la etapa posterior al destete, se realizó trabajo con un sistema “todo dentro/todo fuera” (*all-in-all-out*) por salas, y el engorde final de los animales se realizó en un sistema de flujo continuo.

Se utilizó un total de 105 animales (5 animales/grupo). Hubo hembras y machos genéticos de Agrocere Pig Improvement Company (PIC) obtenidos al cruzar hembras Camborough 1050 con un macho Terminal 337.

Se albergaron en salas con piso completamente de rejilla, con un foso inundable. La densidad fue de 0,33 animales por m² al finalizar la fase de engorde.

Ventilación por medio de cortinas (ventilación natural).

Alimento, agua y manipulación habitual de animales

Alimento

Nacimiento - 15 días de vida: Calostro y leche

15 días hasta destete (21d): leche y alimento previo a la iniciación

21 a 30 días de vida: Alimento F1 (iniciación)

30 a 40 días de vida: Alimento F2

40 a 55 días de vida: Alimento F3 (con amoxicilina (400 ppm) en el alimento)

55 a 70 días de vida: Alimento F4 (con tiamulina (100 ppm) + clortetraciclina (300 ppm) en el alimento)

Agua

Se proporcionó agua *ad libitum*.

Número de chupetes: 1 por cada 10 animales alojados.

Otros tipos de manipulación durante el período de experimentación.

Luego de su admisión en cajones de destete (aprox. 21 días de edad), los lechones recibieron una vacunación contra PCV2 y *Mycoplasma hyopneumoniae*.

42 días de vida: Los cerdos recibieron una nueva vacunación contra *Mycoplasma*.

Aplicación de Ceftiofur inyectable o amoxicilina inyectable en animales con signos del sistema nervioso como resultado de una posible infección por *Streptococcus suis* o *Haemophilus parasuis*.

Tratamientos

Grupos

Vacuna experimental evaluada:

- SV1: Vacuna experimental contra *Streptococcus spp* (Ss)

Vacuna experimental	n	Volumen	Vía de administración	
			1ª dosis	2ª dosis
SV1				
Grupo 1	5	1 mL	PO	PO
Grupo 2	5	1 mL	IM	PO
Grupo 3	5	2 mL (ND)	PO	----
Grupo 4	5	2 mL (ND)	IM	----
Grupo 5	5	2 mL (ND)	PO	PO
Grupo 6	5	2 mL (ND)	IM	PO
Control (solución salina)				
Grupo 7	5	2 mL	IM	PO

Tabla 5: PO: administración oral; IM: intramuscular

Fecha de administración

Primera dosis: Dentro de los primeros 3 días de vida

Segunda dosis: 14 a 18 días después de la primera vacunación.

Administración de vacunación

Administración oral: el volumen ya indicado se administró con un dispensador o una jeringa automática.

Administración intramuscular: el volumen ya indicado se administró con una jeringa automática en la región del cuello, justo atrás y debajo de la oreja, pero frente al hombro.

Preparación de vacunas en el laboratorio

Se extrajeron 10 microlitros de un criovial desde el cultivo de trabajo de SV1, las cuales se colocaron en placas de agar tríptico de soja (TSA) con cloranfenicol (CP5: 5 mg/mL). Las placas se incubaron a 37 °C durante la noche (ON). Al día siguiente, una colonia del cultivo se cultivó en caldo tríptico de soja (TSB) con CP5. El cultivo previo (PC) se incubó a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, se cultivó cierto volumen de caldo tríptico de soja + CP5 en cierto gran volumen de caldo tríptico de soja estéril. El cultivo se incubó durante 2 horas a 37 °C, para luego agregarse cierto volumen de β -D-1-tiogalactopiranosido isopropílico a 0,5 M (1 ml/L) a fin de inducir producción de antígenos, y la incubación se continuó durante otras 6 horas.

Transcurrido un total de 8 horas, se extrajeron muestras para realizar cálculos de unidades formadoras de colonias. Posteriormente, el cultivo se inactivó mediante la adición de cierto volumen de formaldehído, y el cultivo se incubó a temperatura ambiente durante la noche.

El excipiente se preparó a continuación del proceso de preparación habitual.

Las formulaciones para los grupos de dosis de 1 mL y 2 mL se mezclaron en proporciones iguales de cultivo inactivado (SV1) con respecto a excipiente (1:1).

Las formulaciones se envasaron en ampollas de 10 mL, se etiquetaron y almacenaron a entre 2 y 8 °C hasta su uso.

Muestras y parámetros evaluados

Fecha de muestreo

Se extrajeron muestras los siguientes días:

- 1^{er} muestreo: Día de vacunación primaria (semana 1)
- 2^o muestreo: Día de refuerzo (semana 3)
- 3^{er} muestreo: semana 4
- 4^o muestreo: semana 6
- 5^o muestreo: semana 8

Muestreo y procesamiento:

Muestras de suero

Se extrajeron muestras de sangre desde la vena yugular con una aguja 18G x 1,5" para cerdos y una 20G x 1" o 1,5" para lechones. Se extrajeron aproximadamente 5 mL de sangre sin anticoagulante en un tubo cónico de 15 mL. Para extraer suero de la sangre, el suero se dejó coagular en un tubo a un ángulo de al menos 60 grados. Una vez formado el coágulo, se desprende del vidrio con una aguja. Para obtener el máximo de suero, los tubos se calentaron hasta llegar a 37 °C durante un mínimo de 30 minutos a un máximo de 1 hora, para luego colocarse a 4 °C durante la noche. A la mañana siguiente, los tubos se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 30 minutos, y el suero (supernadante) se

extrajo directamente con una pipeta. La cantidad de suero fue entre 500 μ L y 1 mL. El suero se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Muestras de saliva

Las muestras de saliva para determinación de IgA se extrajeron de la siguiente manera:

Hisopos orales: Se recolectó saliva de cerdos con hisopos de algodón estériles, los cuales se colocaron en el hocico del cerdo hasta que se impregnara en saliva. Luego, los hisopos impregnados en saliva se sumergieron en 1 mL de solución salina con buffer de fosfato estéril, pH 7,4, en un tubo cónico de 15 mL y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis.

Análisis

ELISA para determinación de anticuerpos

Se utilizaron relaciones S/P de ELISA para determinar la respuesta de anticuerpos IgA e IgG a SV1 con la siguiente fórmula:

Muestra – control negativo/control positivo – control negativo

Protocolo ELISA:

1) Recubrimiento: Se recubrieron placas de BioGreiner con 5 μ g/mL/pocillo (100 μ L/pocillo) del antígeno peptídico de *Streptococcus* sintético unido por un enlace covalente a albúmina de suero bovino (BSA), para luego incubarse a temperatura ambiente durante la noche.

2) Las placas se lavaron 3 veces con solución salina en buffer de Tris con Tween-20 al 0,1 % (TBS-T) (200 µL/pocillo).

3) Luego, las placas se bloquearon con 200 µL/pocillo de buffer de bloqueo (Bethyl Lab, Cat. E104) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

4) Las placas se lavaron 3 veces con TBS-T (200 µL/pocillo).

5) Las muestras de prueba se diluyeron de la siguiente manera:

- Suero: Dilución 1:100 en buffer de muestra (solución salina en buffer de Tris al 50 mM, pH 8, albúmina de suero bovino al 1 %, Tween-20 al 0,05 %), 100 µL/pocillo.
- Saliva: Sin diluir, 100 µL/pocillo.

La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

6) Las placas se lavaron 3 veces con TBS-T (200 µL/pocillo). A cada pocillo, se le agregaron anticuerpos secundarios, 100 µL/pocillo, en las siguientes concentraciones.

- Peroxidasa de rábano picante (HRP) de IgA anti-cerdo, 1 µg/mL (A100-102P, Bethyl Laboratories).
- Peroxidasa de rábano picante de IgG anti-cerdo, 0,25 µg/mL (A100-205P, Bethyl Laboratories).

Incubados durante 1 hora a temperatura ambiente.

8) Las placas se lavaron 3 veces con TBS-T (200 µL/pocillo).

9) Se agregó sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) de un componente (E102, Bethyl Laboratories) (100 µL/pocillo) y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente.

10) La reacción se detuvo con 100 µL/pocillo de ácido sulfúrico al 0,1 M.

10) La densidad óptica de cada pocillo se leyó a $\lambda = 450$ nm con un espectrofotómetro de luz visible.

Análisis estadístico

Un análisis de varianza se aplicó a dos factores medidos en el tiempo con el software IBM SPSS Statistic 25 luego de determinarse la homocedasticidad de varianzas, la esfericidad y la normalidad de los grupos.

Diseño experimental

El diagrama esquemático que describe el diseño experimental se ilustra en la figura 3.

RESULTADOS

Dos dosis de vacuna experimental SV1 inducen la producción de IgA de secreción de antígeno específico e IgG sérica en lechones de hasta tres días de edad.

Determinación de la relación S/P de IgA de secreción (sIgA) salival

Los resultados se muestran en la tabla 6 y en la figura 4. En algunos grupos evaluados, se observó un aumento de las relaciones S/P de sIgA salival de antígeno específico en cerdos con el paso de las semanas, pero al compararse entre grupos en cada semana, no se observaron diferencias significativas (semanas 1, 3, 4 y 6). La semana 8, los cerdos que recibieron dos dosis de 2 mL de SV1 por vía oral o intramuscular, seguido de un refuerzo oral, tuvieron una relación S/P significativamente mayor con respecto a los demás grupos, sin diferencias significativas entre el grupo de 2 mL oral/oral y el grupo de 2 mL IM/oral. Estos datos indican que la vacuna experimental SV1 es inmunogénica y capaz de inducir la producción de IgA de secreción de antígeno

específico en cerdos de tan solo 3 días de edad. Específicamente, un régimen de 2 mL/dosis administrado por vía oral o por vía intramuscular u oral provoca una sólida respuesta de slgA.

	Edad del animal al momento del muestreo									
	Semana 1		Semana 3		Semana 4		Semana 6		Semana 8	
Grupo	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
2 mL oral	-0,336a	0,422	-0,438a	1,267	0,966a	0,862	0,630a	0,554	0,867abc	0,467
2 mL IM	0,251a	0,810	-0,328a	1,571	0,148a	0,105	0,960a	0,839	0,184ab	0,900
1 mL oral/oral	0,231a	0,803	0,487a	0,718	0,372a	0,546	0,503a	0,174	0,449ab	0,311
1 mL IM/oral	-0,014a	1,112	0,271a	1,594	0,568a	1,261	1,014a	0,448	0,662abc	0,483
2 mL oral/oral	0,279a	0,479	0,036a	1,314	1,223a	0,836	1,648a	0,902	2,054cd	0,176
2 mL IM/oral	-0,069a	0,269	-0,375a	0,786	0,648a	0,276	1,212a	0,782	2,183d	0,541

Tabla 6

Determinación de la relación S/P de IgA sérica

Los resultados se muestran en la tabla 7 y en la figura 5. En algunos grupos evaluados, se observó un aumento de las relaciones S/P de IgG sérica de antígeno específico con el paso de las semanas, pero al compararse entre grupos en cada semana, no se observaron diferencias significativas (semanas 1, 3 y 4). Las semanas 6 y 8, los cerdos que recibieron dos dosis de 2 mL de SV1 por vía oral o intramuscular, seguido de un refuerzo oral, tuvieron una relación S/P significativamente mayor con respecto a los demás grupos. A las 6 semanas de edad, el grupo de 2 mL IM/oral tuvo una relación S/P media significativamente mayor que la del grupo de 2 mL oral/oral, pero a las 8 semanas de edad, esta diferencia desapareció. Estos datos indican que la vacuna experimental SV1 es inmunogénica y capaz de inducir la producción de IgG sérica de

antígeno específico en cerdos de tan solo 3 días de edad. Específicamente, un régimen de 2 mL/dosis administrado por vía oral o por vía intramuscular u oral provoca una sólida respuesta de IgG sérica.

	Edad del animal al momento del muestreo									
	Semana 1		Semana 3		Semana 4		Semana 6		Semana 8	
Grupo	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
2 mL oral	-0,018ab	0,038	-0,056a	0,151	0,143a	0,142	0,532a	0,084	0,233ab	0,172
2 mL IM	-0,015ab	0,05	0,176a	0,453	0,099a	0,1	0,529a	0,719	0,230ab	0,174
1 mL oral/oral	-0,084a	0,035	-0,107a	0,065	0,123a	0,56	0,609ab	0,228	0,341	0,103
1 mL IM/oral	-0,056a	0,021	0,025a	0,138	0,061a	0,113	1,131abc	0,526	0,519	0,339
2 mL oral/oral	-0,050ab	0,031	-0,126a	0,12	0,046a	0,093	1,404abc	0,61	1,668d	0,496
2 mL IM/oral	-0,048ab	0,037	0,018a	0,133	1,181a	1,318	3,052c	0,479	1,878d	0,795

Tabla 7

Conclusión

Estos datos indican que la vacuna experimental SV1 es inmunogénica y antigénica, y lo que es más importante, puede proteger a los peces –en este ejemplo, la tilapia del Nilo– de una provocación con *Streptococcus agalactiae* virulento. Además, la vacuna SV1 induce una sólida respuesta de producción de slgA salival e IgG sérica de antígeno específico en lechones con la primera dosis de la administración de la vacuna con tan solo 3 días de edad. La vía de administración de dos dosis orales o una dosis intramuscular, y la segunda dosis de refuerzo administrada por vía oral, permite obtener respuestas similares para slgA, mientras que la vía intramuscular/oral induce una respuesta de producción mayor y más rápida de IgG sérica, como es lo esperable de acuerdo con los científicos estudiosos de la respuesta y activación inmunitaria, pero la

respuesta a las 8 semanas de edad fue similar, lo que sugiere que la nueva respuesta de anticuerpo de referencia de antígeno específico puede no ser diferente. Mientras que el volumen que induce la mejor respuesta de anticuerpo en cerdos fue 2 mL, este, en última instancia, es irrelevante, ya que la concentración de antígeno/mL se puede ajustar para que un mL de vacuna pueda tener la misma concentración de antígeno que una dosis de 2 mL.

Todos los métodos descritos en el presente documento pueden incorporar cualquier elemento de diseño contenido en esta solicitud y en cualquier otro documento o solicitud incorporada al presente documento como material de consulta.

La presente invención se puede presentar en diferentes formas sin alejarse del espíritu ni de sus atributos esenciales; asimismo, se debe hacer referencia a las reivindicaciones adjuntas, y no en la descripción anterior, para conocer el ámbito de la invención. La invención divulgada con fines ilustrativos en el presente documento se puede poner en práctica de manera adecuada en ausencia de elementos que no se divulguen específicamente en el presente documento.

En el presente documento, el solicitante incorpora la totalidad del archivo XML titulado "SEQUENCE LISTING 3113.005 - Replacement.xml", el cual fue creado el 19 de agosto de 2024 y cuyo tamaño es 7168 bytes, como material de consulta. El listado de secuencias titulado "SEQUENCE LISTING 3113.005 - Replacement.xml" no incluye nuevas materias.

Información del listado de secuencias:

Versión de DTD: V1_3

Nombre de archivo: SEQUENCE LISTING 3113.005.xml

Nombre de software: WIPO Sequence

Versión de software: 2.3.0

Fecha de producción: 2023-05-12

Información general:

Solicitud en curso/IP Office: EE. UU.

Solicitud en curso/referencia de archivo de solicitante: 3113.005

Nombre del solicitante: Ventanco SA

Nombre del solicitante/idioma: en

Nombre del inventor: Sherry Layton

Nombre del inventor/idioma: en

Título de la invención: COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE MEJORA DE
RESPUESTAS INMUNITARIAS A *STREPTOCOCCUS* (en)

Cantidad total de secuencias: 3

Secuencias:

Número de secuencia (ID): 1

Longitud: 49

Tipo de molécula: AA

Ubicación de características/calificadores:

- fuente, 1..49

> mol_type, proteína

> organismo, constructo sintético

Residuos:

DPVLVGQEAV AIGELLAESD PKKADYYCQN AATLEGKGPK LADKYSPIF

49

Número de secuencia (ID): 2

Longitud: 878

Tipo de molécula: AA

Ubicación de características/calificadores:

- fuente, 1..878

> mol_type, proteína

> organismo, constructo sintético

Residuos:

MLKATSKTFV TQHTAFSYTA QRFGLKQLGI AGVSEEEESP PLTKVPGLED

MEAGQGIDEA 60

SLYDPHTWDP VLVGQEAVAI GELLAESDPK KADYYCQNAA TLEGKGPKLA

DKYSPIFSSS 120

SSMSGKGPAI GIDLGTTYSC VGVFQHGKVE IANDQGNRT TPSYVAFTDT
ERLIGDAAKN 180

QVAMNPTNTI FDAKRLIGRK YDDPTVQSDM KHWPFRVVNE GGKPKVQVEY
KGEMKTFFPE 240

EISSMVLTKM KEIAEAYLGK KVETAVITVP AYFNDSQRQA TKDAGTITGL
NVMRIINEPT 300

AAAIAYGLDK KGTRAGEKNV LIFDLGGGTF DVSILTIEDG IFEVKSTAGD
THLGGEDFDN 360

RMVNRVVEEF KGKHKRDNAG NKRAVRRRLRT ACERARRTLS SSTQASIEID
SLFEGIDFYT 420

SITRARFEEL NADLFRGTLE PVEKALRDAK LDKGQIQEIV LVGGSTRIPK
IQKLLQDFFN 480

GKELNKSINP DEAVAYGAAV QAAILMGDKS ENVQDLLLLD VTPLSLGIET
AGGVMTALIK 540

RNTTIPTKQT QTFTTYSNQN SSVLVQVYEG ERAMTKDNNL LGKFDLTGIP
PAPRGVPQIE 600

VTFDIDANGI LNVSAVDKST GKENKITITN DKGRLSKDDI DRMVQEAEKY
KAEDEANRDR 660

VGAKNSLESY TYNMKQTVED EKLKGKISDQ DKQKVLDKCQ EVISSLDRNQ
MAEKEEYEHK 720

QKELEKLCNP IVTKLYQGAG GAGAGGSGGP TIEEVDSSSS SSDPVLVGQE
AVAIGELLAE 780

SDPKKADYYC QNAATLEGKG PKLADKYSPI FPLTKVPGLE DMEAGQGIDE
ASLYDPHTWL 840

KATSKTFVTQ HTAFSYTAQR FGLKQLGIAG VSEEEPSP 878

Número de secuencia (ID): 3

Longitud: 2643

Tipo de molécula: AA

Ubicación de características/calificadores:

- fuente, 1..2643

> mol_type, proteína

> organismo, constructo sintético

Residuos:

ATGTTAAAGG CTACATCCAA GACTTTTGTT ACACAGCACA CGGCTTTCAG
TTATACAGCG 60

CAACGGTTTG GCTTGAAGCA GTTAGGGATT GCAGGTGTGA
GTGAAGAGGA ACCGTCCCCT 120

CCATTAACAA AAGTCCCTGG GTTGAAGAC ATGGAGGCCG
GGCAAGGGAT TGATGAAGCC 180

TCACTCTATG ATCCTCATAC TTGGTTGGAC CCGGTGCTTG TCGGTCAGGA
GGCGGTAGCC 240

ATCGGAGAGC TTTTGGCTGA ATCAGATCCG AAGAAAGCTG ATTATTACTG
CCAAAACGCG 300

GCTACTTTAG AGGGTAAAGG GCCAAAGCTC GCTGACAAGT ATTCACCGAT
ATTTTCATCG 360

AGTTCATCAA TGAGCGGAAA GGGCCCTGCC ATTGGAATCG
ATCTGGGCAC AACATACAGC 420

TGTGTGGGAG TATTTACAGCA CGGCAAGGTT GAAATCATTG CAAATGACCA
AGGCAACAGA 480

ACAACGCCGT CATATGTCGC TTTTACAGAT ACTGAACGCC TCATCGGCGA
CGCTGCCAAA 540

AACCAAGTGG CGATGAATCC GACAAATACG ATTTTCGACG CGAAACGTCT
CATTGGACGG 600

AAATACGATG ATCCAACAGT ACAATCTGAT ATGAAACATT GGCCGTTTCG
GGTCGTCAAC 660

GAAGGAGGAA AGCCCAAAGT GCAGGTCGAG TATAAAGGAG
AAATGAAAAC TTTCTTTCCC 720

GAAGAGATAA GTTCCATGGT TTAAACAAAA ATGAAGGAAA TTGCCGAGGC
TTATTTAGGA 780

AAAAAGGTGG AAACGGCGGT GATCACCGTG CCGGCATATT TTAATGATAG
CCAGCGCCAG 840

GCAACCAAGG ATGCGGGAAC CATTACAGGC TTAAATGTTA TGAGAATTAT
TAATGAACCT 900

ACTGCCGCAG CAATCGCTTA CGGACTGGAT AAAAAAGGAA
CAAGAGCAGG CGAAAAGAAT 960

GTA CTGATTTT TTGATTTAGG GGGAGGTACC TTCGACGTGT CCATTCTTAC
TATAGAAGAC 1020

GGCATCTTTG AAGTGAAATC AACAGCAGGA GATACACACT
TGGGCGGTGA GGATTTTGAC 1080

AACCGGATGG TCAATAGATT CGTCGAAGAA TTAAAGGAA AGCATAAACG
CGACAATGCC 1140

GGGAACAAAA GGGCTGTACG ACGGCTGAGG ACTGCCTGTG
AAAGAGCGCG GCGTACGCTC 1200

TCCTCCTCCA CACAGGCTTC AATTGAGATA GATTCGCTTT TCGAAGGCAT
TGACTTCTAC 1260

ACTAGCATTG CTCGTGCGCG CTTTGAAGAA CTGAATGCGG ATCTGTTTCG
AGGCACGCTG 1320

GAGCCGGTTG AAAAAGCGCT CAGAGATGCA AAGTTGGACA
AAGGCCAGAT TCAAGAAATC 1380

GTACTGGTTG GAGGCAGCAC ACGCATTCCT AAAATCCAAA AGCTTCTCCA
GGATTTTTTTT 1440

AACGGCAAAG AGCTGAATAA ATCGATCAAC CCGGATGAAG CGGTTGCATA
TGGCGCCGCC 1500

GTTCAAGCGG CGATCCTGAT GGGTGATAAA AGCGAAAACG
TCCAGGACCT TCTGCTTTTA 1560

GATGTTACGC CTTTATCACT GGGGATTGAA ACAGCCGGCG
GGGTCATGAC GGCTTTGATT 1620

AAACGAAATA CGACCATACC GACGAAGCAG ACACAAACAT TTACGACGTA
CAGCGATAAT 1680

CAGTCATCGG TACTCGTCCA GGTTTATGAA GGAGAACGTG CAATGACAAA
AGATAACAAC 1740

CTTTTGGGGA AATTTGATCT CACAGGGATT CCGCCTGCAC CAAGGGGTGT
GCCTCAAATT 1800

GAAGTAACCT TTGATATCGA CGCCAACGGG ATCTTGAATG TTAGTGCTGT
TGATAAGAGT 1860

ACCGGCAAGG AAAATAAAAT TACAATAACA AACGATAAAG GCAGACTATC
TAAAGACGAT 1920

ATTGACCGCA TGGTGCAAGA GGCTGAAAAG TACAAAGCAG
AGGATGAAGC AAACCGTGAC 1980

CGTGTAGGAG CAAAAAACAG CTTAGAAAGC TATACATATA ATATGAAACA
AACAGTGGAA 2040

GATGAGAAAC TGAAGGGGAA AATAAGCGAT CAAGACAAAC AGAAAGTTCT
TGATAAATGC 2100

CAGGAAGTCA TCTCATCTTT AGATAGAAAT CAAATGGCGG AGAAAGAAGA
ATATGAGCAT 2160

AAGCAAAAAG AGCTGGAAAA ATTATGCAAT CCAATCGTTA CGAAACTTTA
TCAAGGAGCC 2220

GGTGGTGCAG GTGCTGGGGG TTCTGGCGGC CCGACCATTG
AGGAAGTTGA CAGCTCATCT 2280

TCTTCCTCTG ACCCTGTCCT TGTCGGACAG GAAGCCGTGG CAATTGGTGA
ATTGCTGGCA 2340

GAATCTGATC CAAAAAAGC GGACTATTAT TGTCAAATG CAGCCACGCT
TGAAGGTAAA 2400

GGTCCGAAAC TAGCCGATAA ATACTCTCCT ATCTTCCCAT TAACAAAAGT
CCCTGGGTTG 2460

GAAGACATGG AGGCCGGGCA AGGGATTGAT GAAGCCTCAC
TCTATGATCC TCATACTTGG 2520

TTGTTAAAGG CTACATCCAA GACTTTTGTT ACACAGCACA CGGCTTTCAG
TTATACAGCG 2580

CAACGGTTTG GCTTGAAGCA GTTAGGGATT GCAGGTGTGA
GTGAAGAGGA ACCGTCCCCT 2640

TAA 2643

FIN