



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0025495

(51)⁷ A61K 39/09

(13) B

(21) 1-2015-00260

(22) 24/06/2013

(86) PCT/US2013/047282 24/06/2013

(87) WO2014/004361 03/01/2014

(30) 61/664,935 27/06/2012 US

(45) 25/09/2020 390

(43) 25/03/2015 324A

(73) MERIAL LIMITED (US)

3239 Satellite Blvd., Duluth, GA 30096, United States of America

(72) BEY, Russell, F. (US); LAWRENCE, Paulraj, Kirubakaran (US); SIMONSON, Randy, R. (US); SIRIGIREDDY, Kamesh, Reddy (US); McKEOWN, Danielle, A. (US).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHŨNG VI KHUẨN STREPTOCOCCUS SUIS NHƯỢC ĐỘC VÀ CHẾ PHẨM MIỄN DỊCH CHỨA CHŨNG VI KHUẨN NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *S. suis* nhược độc gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật *S. suis*, chế phẩm chứa chủng này. Sáng chế còn đề cập đến các đột biến được gây ra bằng cách gây đột biến trong các gen của *S. suis*, hữu ích trong việc tạo ra các chủng vi khuẩn *S. suis* nhược độc mới.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các vaccin chứa vi khuẩn nhược độc, đặc biệt là các vaccin có tác dụng bảo vệ rộng, an toàn, và hiệu quả cho lợn chống lại bệnh nhiễm trùng/bệnh do vi khuẩn *Streptococcus suis* gây ra. Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp tạo ra vi khuẩn nhược độc, và việc xác định các biến đổi của axit nucleic có liên quan đến việc làm giảm độc lực của vi khuẩn.

Do đó, sáng chế đề cập đến chế phẩm sinh miễn dịch hoặc vaccin chứa vi khuẩn theo sáng chế; ví dụ, vi khuẩn sống nhược độc. Vi khuẩn này cũng có thể được làm bất hoạt trong chế phẩm; nhưng có thể có lợi nếu vi khuẩn này là vi khuẩn *S. suis* sống nhược độc. Tiếp theo, sáng chế đề cập đến các phương pháp sản xuất và/hoặc bào chế các chế phẩm này; ví dụ, nuôi cấy hoặc phát triển hoặc nhân giống vi khuẩn trên hoặc trong môi trường thích hợp, thu nhận vi khuẩn, tùy ý làm bất hoạt vi khuẩn, và tùy ý trộn vi khuẩn này với chất mang, tá dược, chất pha loãng hoặc chất dẫn thuốc và/hoặc tá chất và/hoặc chất ổn định dùng trong thú y hoặc dược dụng thích hợp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Streptococcus suis là cầu khuẩn gram dương gây nhiễm bệnh chủ yếu cho lợn. Trong khi lợn trưởng thành là thể mang bệnh không biểu hiện triệu chứng, vi khuẩn này có thể gây bệnh viêm màng não, bệnh nhiễm trùng máu, bệnh viêm khớp và bệnh viêm cuống phổi ở lợn con. Lợn trưởng thành thường mang *S. suis* dưới dạng cộng sinh trong hốc amidan và đường hô hấp trên, nhưng vi khuẩn này cũng được phân lập từ đường dạ dày-ruột và đường sinh dục. Gần như tất cả lợn trưởng thành là nguồn lây nhiễm *S. suis* và mầm bệnh này ảnh hưởng đến ngành công nghiệp lợn trên toàn thế giới.

Ngoài ra, *S. suis* còn gây nhiễm ở nhiều động vật có vú và các loài chim [Gottschalk et al., 2007]. Hơn nữa, *S. suis* là tác nhân quan trọng gây bệnh động vật truyền sang người [Perch et al., 1968], tuy vậy việc nhiễm *S. suis* sang người rất hiếm gặp ở châu Âu và Bắc Mỹ. Hầu hết các trường hợp nhiễm bệnh này ở Bắc Mỹ và châu Âu có liên quan đến tiếp xúc nghề nghiệp với lợn hoặc các sản phẩm từ lợn. Tuy nhiên, tỷ lệ mắc phải bệnh nhiễm trùng *S. suis* ở người là lớn hơn ở Đông Nam Á và Trung Quốc. Mặc dù bệnh viêm màng não là biểu hiện phổ biến nhất ở người, nhưng đôi khi cũng có biểu hiện bệnh nhiễm trùng máu và bệnh viêm nội tâm mạc.

Trong số 33 kiểu huyết thanh đã biết của *S. suis*, kiểu huyết thanh 2 thường có liên quan nhất đến bệnh viêm màng não và bệnh viêm khớp ở lợn từ Bắc Mỹ và châu Âu [Fittipaldi et al., 2009; Higgins and Gottschalk, 2006]. Các yếu tố độc lực khác nhau của *S. suis* bao gồm: nang, protein gắn kết fibronectin/fibrinogen, yếu tố giống độ đục huyết thanh và các cải biến của axit lipoteichoic và peptidoglycan của thành tế bào [Baums và các đồng tác giả, 2006; Chabot-Roy và các đồng tác giả, 2006; de Greeff và các đồng tác giả, 2002; Fittipaldi và các đồng tác giả, 2008a,b; Smith và các đồng tác giả, 1999]. Ngoài ra, các yếu tố độc lực chung giữa các chủng khác nhau có cùng kiểu huyết thanh thể hiện sự biến đổi rộng [Berthelot-Herault và các đồng tác giả, 2005; Quessy và các đồng tác giả, 1995; Vecht và các đồng tác giả, 1992]. Các chất đánh dấu kiểu hình xác định độc lực của *S. suis* bao gồm yếu tố tan máu, suilysin (được mã hóa bởi gen *sly*), LPXTG-protein là protein được giải phóng bởi muramidaza [MRP, 136 kDa, được mã hóa bởi gen *mrp*] và yếu tố protein ngoại bào được tiết [EF, 110 kDa, được mã hóa bởi gen *epf*]. Có sự tương quan đồng biến giữa sự có mặt của các protein độc lực này và kiểu hình của virus ở các chủng *S. suis* Âu Á [Gottschalk và các đồng tác giả, 2007; Vecht và các đồng tác giả, 1991]. Ở các lục địa này, các chủng MRP⁺EF⁺SLY⁺ có kiểu huyết thanh 2 chủ yếu được phân lập từ lợn bị bệnh có dấu hiệu lâm sàng của bệnh nặng trong khi các chủng MRP⁻EF⁻SLY⁻ thường được phân lập từ lợn khỏe mạnh [Allgaier và các đồng tác giả, 2001; Vecht và các đồng tác giả, 1992].

Các tế bào nguyên vẹn và nhiều protein của *S. suis* đã được nghiên cứu làm vaccin dự tuyển tiềm năng. Việc tạo miễn dịch bằng vaccin chứa vi khuẩn kiểu đại hoàn toàn bảo vệ chống được lây nhiễm bằng kiểu huyết thanh đồng loại trong khi thể đột biến không được kết nang không tạo được tác dụng bảo vệ [Wisselink và các đồng tác giả, 2002]. Trong nghiên cứu được tiến hành bởi Li và các đồng tác giả, SAO (protein bề mặt của *S. suis*) tái tổ hợp kết hợp với Quil A đã bảo vệ chống được bệnh gây ra bởi *S. suis* kiểu huyết thanh 2 ở lợn. Việc tạo miễn dịch trong cơ bằng SAO gây ra đáp ứng kháng thể dịch thể đáng kể, nhưng chủ yếu là IgG2. Việc tạo miễn dịch bằng SAO tái tổ hợp cũng cảm ứng các kháng thể thực bào opsonin [Li và các đồng tác giả, 2007]. Việc tạo miễn dịch cho lợn con bằng suilysin đã tinh chế từ chủng *S. suis* P1/7 (kiểu huyết thanh 2), làm tăng hiệu giá của kháng thể trung hòa, gợi ý rằng SLY có thể có chức năng làm kháng nguyên bảo vệ [Jacobs và các đồng tác giả, 1996]. Tuy nhiên, không thử nghiệm nào trong số các thử nghiệm này sử dụng các kiểu huyết thanh dị loại để thử nghiệm gây nhiễm cho lợn được chủng ngừa bằng các kháng nguyên này. Trong nghiên cứu của Baums và các đồng tác giả,

vacxin chứa vi khuẩn *S. suis*, kiểu huyết thanh 2 gây ra tác dụng miễn dịch bảo vệ đối với thử nghiệm gây nhiễm đồng loại. Ngược lại, hiệu lực bảo vệ của vacxin tiểu đơn vị MAP là thấp, mặc dù việc tạo miễn dịch bởi MAP dẫn đến hiệu giá của IgG2 trong huyết thanh cao hơn so với MRP và SAO. Quan trọng là, việc tạo miễn dịch bằng vacxin chứa vi khuẩn mà không phải bằng MAP gây ra sự opsonin hóa hiệu giá kháng thể kháng chủng có kiểu huyết thanh 2, và các hiệu giá kháng thể này được thấy là có tương quan với tác dụng bảo vệ. Tuy nhiên, sau khi hấp thu thể đột biến đẳng hợp tử không được kết nang, huyết thanh lợn con được gây miễn dịch bằng vacxin chứa vi khuẩn lại không thuận lợi cho việc diệt bạch cầu trung tính, chứng tỏ rằng các kháng thể nhằm trực tiếp vào nang có thể không cần thiết cho sự thực bào opsonin [Baums et al., 2009]. Ngoài ra, không phát hiện thấy sự cảm ứng của các kháng thể opsonin hóa kháng kiểu huyết thanh 9 trong nhóm nhận vacxin chứa vi khuẩn hoặc trong nhóm nhận vacxin MAP, dẫn đến tác dụng bảo vệ kháng các chủng có kiểu huyết thanh 9 thấp.

Chưa có nghiên cứu nào tạo ra được vacxin phổ rộng để chống lây nhiễm *S. suis*. Ngoài ra, hiểu biết về sinh bệnh học của *S. suis* ở mức độ phân tử còn chưa được nhất quán do có nhiều yếu tố độc lực trong các chủng trong một kiểu huyết thanh và cơ chế phân tử phức hợp xảy ra trong quá trình tương tác với vật chủ của nó. Thiếu vacxin có hiệu quả chống nhiễm *S. suis* là vấn đề bức xúc trong chăn nuôi lợn hiện đại. Do đó, mục đích chủ yếu của sáng chế này là đề xuất vacxin *S. suis* an toàn và có hiệu quả.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất vacxin nhược độc cũng như mô tả phương pháp điều trị và dự phòng nhiễm *S. suis*.

Sáng chế còn đề xuất các chủng *S. suis* nhược độc mới, tạo ra tác dụng miễn dịch bảo vệ an toàn, có hiệu quả, và rộng. So với chủng *S. suis* gốc, các chủng nhược độc có thể có một hoặc nhiều nucleotit biến thể đa hình, sự có mặt của chúng liên quan đến độc lực giảm.

Sáng chế đề xuất các vi khuẩn đột biến chứa (các) đột biến trong một hoặc nhiều trình tự axit nucleic, so với các vi khuẩn kiểu dại/gốc, chúng làm cho các vi khuẩn đột biến này bị nhược độc, so với các vi khuẩn gốc, các vi khuẩn gốc này chứa các axit nucleic mã hóa protein kiểu dại có trình tự peptit như được nêu trong SEQ ID NO:2, 6, và 10. Theo một phương án cụ thể, các vi khuẩn đột biến chứa các trình tự axit nucleic như được nêu trong SEQ ID NO:3, 7, và 11, mã hóa các peptit như được nêu trong SEQ ID NO:4, 8, và 12,

và làm cho các vi khuẩn đột biến này bị nhược độc/không độc, so với các vi khuẩn kiểu dại/gốc có tính độc. Theo một phương án khác, các vi khuẩn đột biến có các đột biến khác trong các peptit kiểu dại như được nêu trong SEQ ID NO:2, 6, và 10 (tức là không phải các đột biến tạo ra các peptit như được nêu trong SEQ ID NO:4, 8, và 12), dẫn đến các vi khuẩn đột biến này bị nhược độc so với chủng kiểu dại/gốc.

Theo một phương án cụ thể, các chủng này có thể có “dạng gen thay thế”, được xác định trong bản mô tả này là “các alen”, so với chủng *S. suis* gốc của chúng. Theo một phương án, các alen thay thế chịu trách nhiệm về độc lực được làm giảm hoặc yếu. Như được xác định trong bản mô tả này, thuật ngữ “gen” sẽ được sử dụng với nghĩa rộng, và sẽ bao gồm cả các trình tự mã hóa và không mã hóa (tức là các trình tự điều hòa trước và sau, trình tự khởi động, 5’/3’ UTR, các intron, và exon). Khi chỉ đề cập đến trình tự mã hóa của gen, thì thuật ngữ “trình tự mã hóa của gen” hoặc “CDS” (coding sequence) sẽ được sử dụng thay thế cho nhau trong suốt bản mô tả này.

Theo một phương án cụ thể, các chủng nhược độc có một hoặc nhiều (các) hiện tượng đa hình trong rpsL-S12 (protein tiểu đơn vị ribosom 30S), protein màng gắn kết ATP vận chuyển ABC (ABC transporter ATP binding membrane protein - ABC-ATPBMP), và trình tự điều hòa phiên mã của vi khuẩn (marR), cả ba hoặc tổ hợp của chúng. Theo một phương án, có ít nhất 4 khác biệt nucleotit giữa chủng nhược độc và chủng gốc của nó: 2 SNP trong rpsL-S12 và 1 SNP trong ABC-ATPBMP và marR.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến các chủng *S. suis* biến đổi gen, trong đó biểu hiện của rpsL-S12, ABC-ATPBMP, và marR hoặc cả ba, được thay đổi so với chủng *S. suis* gốc, dẫn đến làm giảm độc lực của chủng biến đổi gen.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra vi khuẩn *S. suis* nhược độc, bao gồm các bước:

- (a) nuôi cấy chủng *S. suis* gốc với sự có mặt của chất gây đột biến;
- (b) gieo các tế bào sống sót vào môi trường thích hợp;
- (c) kiểm tra các khuẩn lạc riêng bằng cách tiêm cho lợn để xác định độc lực;
- (d) xác định là chủng nhược độc nếu lợn không có dấu hiệu lâm sàng liên quan đến nhiễm bởi chủng gốc.

Theo một phương án, các vacxin nhược độc còn chứa tá chất. Tá chất có thể là chất bất kỳ làm tăng và/hoặc tăng thêm đáp ứng miễn dịch được gây ra, so với vacxin nhược độc đơn lẻ. Các tá chất dùng qua niêm mạc, bao gồm

chitosan và các dẫn xuất của nó, là đặc biệt hữu ích đối với các vacxin nhược độc dùng qua đường miệng được bộc lộ.

Sáng chế còn mô tả phương pháp gây đáp ứng miễn dịch (hoặc sinh miễn dịch) hoặc bảo vệ chống *S. suis*, cũng như phương pháp phòng ngừa hoặc điều trị *S. suis*, hoặc (các) tình trạng bệnh gây ra do *S. suis*, bao gồm bước cho các động vật có nhu cầu dùng vi khuẩn nhược độc, hoặc chế phẩm chứa vi khuẩn nhược độc này.

Kit chứa ít nhất là chủng *S. suis* nhược độc và hướng dẫn sử dụng cũng được đề xuất.

Các phương án này và các phương án khác được bộc lộ hoặc là hiển nhiên từ và được bao gồm trong phần mô tả chi tiết dưới đây.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất các trình tự nucleotit và các gen liên quan đến việc làm giảm độc lực của vi sinh vật, như vi khuẩn, ví dụ, vi khuẩn Gram dương, như *Streptococcus suis* (*S. suis*), các sản phẩm (ví dụ, protein, kháng nguyên, chất kháng nguyên, epitop) được mã hóa bởi các trình tự nucleotit, phương pháp tạo ra các trình tự nucleotit, các sản phẩm, vi sinh vật này, và sử dụng chúng, như để bào chế vacxin hoặc các chế phẩm sinh miễn dịch hoặc để gây ra đáp ứng miễn dịch học hoặc đáp ứng miễn dịch hoặc làm vector, ví dụ, làm vector biểu hiện (ví dụ, vector biểu hiện *in vitro* hoặc *in vivo*).

Các đột biến được đưa vào các trình tự nucleotit và gen của vi sinh vật tạo ra các thể đột biến nhược độc mới và không hiển nhiên. Các thể đột biến này là hữu ích để sản xuất chế phẩm sinh miễn dịch sống nhược độc hoặc vacxin sống nhược độc có mức độ sinh miễn dịch cao.

Các thể đột biến này cũng hữu ích làm vector có thể hữu ích để biểu hiện *in vitro* của các sản phẩm biểu hiện, cũng như để tái tạo hoặc sao chép các trình tự nucleotit (ví dụ, sao chép ADN), và cho các sản phẩm biểu hiện *in vivo*.

Việc nhận diện các đột biến tạo ra các trình tự nucleotit và các gen mới và không hiển nhiên, cũng như các sản phẩm gen mới và không hiển nhiên được mã hóa bởi các trình tự nucleotit và các gen này.

Các sản phẩm gen này tạo ra các kháng nguyên, chất kháng nguyên và epitop, và hữu ích làm các sản phẩm gen được phân lập.

Các sản phẩm gen được phân lập này, cũng như các epitop của chúng, cũng hữu ích để tạo ra kháng thể, các kháng thể này hữu ích trong các ứng dụng chẩn đoán.

Các sản phẩm gen, có thể cung cấp hoặc tạo ra epitop, kháng nguyên

hoặc chất kháng nguyên, cũng hữu ích cho các chế phẩm sinh miễn dịch hoặc miễn dịch, cũng như các vaccin.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vi khuẩn chứa đột biến giảm độc lực trong trình tự nucleotit hoặc gen trong đó đột biến này cải biến, làm giảm hoặc làm mất biểu hiện và/hoặc hoạt tính sinh học của polypeptit hoặc protein được mã hóa bởi gen, dẫn đến độc lực của vi khuẩn được làm giảm.

Đột biến này không nhất thiết phải nằm trong trình tự mã hóa hoặc gen để phá vỡ chức năng của nó, dẫn đến làm giảm độc lực. Đột biến này cũng có thể được tạo ra trong các trình tự nucleotit liên quan trong quá trình điều hòa biểu hiện của gen, ví dụ, trong các vùng điều hòa sự khởi đầu phiên mã, dịch mã và kết thúc phiên mã. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến các trình tự khởi động và các vùng gắn kết ribosom (nói chung các yếu tố điều hòa này nằm ở khoảng giữa 60 và 250 nucleotit phía trước codon mở đầu của trình tự mã hóa hoặc gen; Doree S M et al., J. Bacteriol. 2001, 183(6): 1983-9 ; Pandher K et al., Infect. Imm. 1998, 66(12): 5613-9 ; Chung J Y et al., FEMS Microbiol letters 1998, 166: 289-296), các vùng kết thúc phiên mã (nói chung vùng kết thúc này nằm trong vòng khoảng 50 nucleotit phía sau codon kết thúc của trình tự mã hóa hoặc gen ; Ward C K et al., Infect. Imm. 1998, 66(7): 3326-36). Trong trường hợp operon, các vùng điều hòa này có thể nằm ở khoảng cách lớn hơn phía trước của gen hoặc trình tự mã hóa. Đột biến trong vùng liên gen cũng có thể dẫn đến làm giảm độc lực.

Đột biến trong các trình tự điều hòa này liên quan đến trình tự mã hóa hoặc gen sao cho đột biến của trình tự nucleotit này cải biến, ức chế hoặc làm mất sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính sinh học của polypeptit hoặc protein được mã hóa bởi gen này, dẫn đến độc lực của vi khuẩn được làm giảm sẽ tương đương với đột biến trong gen hoặc trình tự mã hóa được nhận diện theo sáng chế

Việc làm giảm độc lực làm giảm hoặc làm mất khả năng gây bệnh của vi khuẩn và tính trầm trọng của các dấu hiệu lâm sàng hoặc tổn thương, làm giảm tốc độ phát triển của vi khuẩn, và ngăn ngừa sự chết do vi khuẩn.

Đặc biệt là, sáng chế đề cập đến các chủng *S. suis* nhược độc và các vaccin chứa các chủng này, gây ra đáp ứng sinh miễn dịch ở động vật, cụ thể là các chủng *S. suis* nhược độc gây ra, sinh hoặc kích thích đáp ứng ở loài lợn.

Các chủng *S. suis* nhược độc cụ thể cần quan tâm có các đột biến trong gen, so với chủng gốc có tính độc kiểu dại, liên quan đến độc lực. Nhận thấy rằng ngoài các chủng có các đột biến được nêu, các chủng nhược độc có số lượng đột biến bất kỳ trong các gen độc lực được bộc lộ có thể được sử dụng

trong thực hành sáng chế này.

Theo một phương án, các chủng nhược độc chứa các trình tự axit nucleic bao gồm các nucleotit như được nêu trong SEQ ID NO:3, 7, 11, hoặc tổ hợp của chúng. Tại thời điểm của sáng chế này, các trình tự này không được biết là tồn tại trong hệ gen *S. suis* có trong tự nhiên bất kỳ, và chỉ được tạo ra như là kết quả của các phương pháp gây đột biến của các tác giả sáng chế, phương pháp này đã được thực hiện trên chủng gốc có tính độc, trong đó các gen kiểu dại chứa các nucleotit như được nêu trong SEQ ID NO:1, 5, và 9.

Theo một phương án khác, các chủng *S. suis* nhược độc chứa các axit nucleic mã hóa các peptit có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:4, 8, 12 hoặc tổ hợp của chúng. Theo một phương án khác nữa, các chủng này chứa các axit nucleic mã hóa các peptit có ít nhất một thay thế axit amin so với các trình tự như được nêu trong SEQ ID NO:2, 6, 10 hoặc tổ hợp của chúng. Theo một phương án, sự thay thế này là như được phác họa trong Bảng 1 (đối với chủng vaccin).

Theo một phương án khác nữa, chủng *S. suis* nhược độc có các đột biến trong cùng gen, so với chủng gốc có tính độc của nó, như chủng được lưu giữ ở ATCC (Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật Mỹ) với ký hiệu lưu giữ số PTA-13269. Các đột biến này làm cho chủng nhược độc có độc lực giảm so với chủng gốc có tính độc của nó.

Theo một phương án cụ thể, chủng nhược độc là chủng được lưu giữ ở ATCC với ký hiệu lưu giữ số PTA-13269.

Theo một phương án khác, các chủng *S. suis* nhược độc mới được bào chế thành vaccin an toàn, hiệu quả chống *S. suis* và bệnh nhiễm / các bệnh do *S. suis* gây ra.

Theo một phương án, vaccin *S. suis* còn chứa tá chất. Theo một phương án cụ thể, tá chất này là tá chất dùng qua niêm mạc, như chitosan, chitosan được metyl hóa, chitosan được trimetyl hóa, hoặc các dẫn xuất hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, tá chất này bao gồm vi khuẩn và/hoặc virus nguyên vẹn, bao gồm *H. parasuis*, clostridium, virus influenza ở lợn (swine influenza virus - SIV), circovirus ở lợn (porcine circovirus - PCV), virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus - PRRSV), Mannheimia, Pasteurella, Histophilus, Salmonella, *Escherichia coli*, hoặc tổ hợp và/hoặc biến thể của chúng. Theo một số phương án, tá chất này làm tăng mức sản sinh IgM, IgG, IgA, và/hoặc tổ hợp của chúng ở động vật.

“Kháng nguyên” hoặc “chất kháng nguyên” có nghĩa là chất gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu ở động vật chủ. Kháng nguyên này có thể bao gồm sinh vật nguyên vẹn, được làm chết, nhược độc hoặc sống; tiểu đơn vị hoặc một phần của sinh vật; vector tái tổ hợp chứa đoạn xen có đặc tính sinh miễn dịch; đoạn hoặc mảnh ADN có khả năng gây ra đáp ứng miễn dịch khi trình diện với động vật chủ; polypeptit, epitop, hapten, hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng. Theo cách khác, chất kháng nguyên hoặc kháng nguyên có thể bao gồm độc tố hoặc kháng độc tố.

Các thuật ngữ “protein”, “peptit”, “polypeptit” và “mảnh polypeptit” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này để chỉ các polyme chứa các gốc axit amin có độ dài bất kỳ. Polyme này có thể có mạch thẳng hoặc phân nhánh, nó có thể bao gồm các axit amin được cải biến hoặc các chất tương tự axit amin, và nó có thể bị gián đoạn bởi các gốc hóa học không phải axit amin. Các thuật ngữ này cũng bao gồm polyme axit amin được cải biến một cách tự nhiên hoặc bằng cách can thiệp; ví dụ, tạo ra liên kết disulfua, glycosyl hóa, lipit hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa, hoặc thao tác hoặc cải biến khác bất kỳ, như liên hợp với thành phần đánh dấu hoặc có hoạt tính sinh học.

Thuật ngữ “polypeptit sinh miễn dịch hoặc kháng nguyên” được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm các polypeptit có hoạt tính miễn dịch với nghĩa là ngay khi được dùng cho vật chủ, nó có thể gây ra đáp ứng miễn dịch kiểu dịch thể và/hoặc tế bào trực tiếp chống lại protein. Tốt hơn là mảnh protein là mảnh có hoạt tính miễn dịch gần giống như protein toàn phần. Do đó, mảnh protein theo sáng chế bao gồm hoặc về cơ bản được cấu thành từ hoặc gồm có ít nhất một epitop hoặc yếu tố quyết định kháng nguyên. Protein hoặc polypeptit “sinh miễn dịch”, được sử dụng trong bản mô tả này, bao gồm trình tự có chiều dài đầy đủ của protein, chất tương tự của chúng, hoặc các mảnh sinh miễn dịch của chúng. “Mảnh sinh miễn dịch” có nghĩa là mảnh của protein bao gồm một hoặc nhiều epitop và do đó gây ra đáp ứng miễn dịch được mô tả trên đây. Các mảnh như vậy có thể được nhận diện bằng cách sử dụng một số bất kỳ các kỹ thuật lập bản đồ epitop đã biết trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996). Ví dụ, các epitop thẳng có thể được xác định bằng cách, ví dụ, tổng hợp đồng thời một số lượng lớn các peptit trên giá đỡ rắn, các peptit này tương ứng với các phần của phân tử protein, và cho các peptit này phản ứng với các kháng thể trong khi các peptit này vẫn được gắn với giá đỡ. Các kỹ thuật như vậy là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong, ví dụ, patent Mỹ số 4,708,871; Geysen và các đồng tác giả, 1984; Geysen và các đồng tác giả, 1986. Tương tự,

các epitop cấu hình riêng được nhận diện dễ dàng bằng cách xác định cấu hình trong không gian của các axit amin như bằng, ví dụ, tinh thể học tia x và cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều. Xem, ví dụ, các quy trình lập bản đồ epitop, nêu trên. Các phương pháp đặc biệt có thể áp dụng được cho các protein của *T. parva* được mô tả đầy đủ trong PCT/US2004/022605 được hợp nhất vào bản mô tả này bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Như được bàn luận trong bản mô tả này, sáng chế đề xuất các mảnh và các biến thể có hoạt tính của polypeptit kháng nguyên. Do đó, thuật ngữ "polypeptit sinh miễn dịch hoặc kháng nguyên" còn bao gồm sự mất đoạn, thêm đoạn và thay thế vào trình tự, miễn là các polypeptit này có chức năng tạo ra đáp ứng miễn dịch như được xác định trong bản mô tả này. Thuật ngữ "sự biến đổi bảo toàn" chỉ sự thay thế gốc axit amin bằng một gốc khác tương tự về mặt sinh học, hoặc sự thay thế nucleotit trong trình tự axit nucleic sao cho gốc axit amin được mã hóa không thay đổi hoặc là một gốc khác tương tự về mặt sinh học. Về mặt này, sự thay thế được đặc biệt ưu tiên thường sẽ được bảo toàn trong tự nhiên, tức là sự thay thế diễn ra trong họ các axit amin. Ví dụ, các axit amin nói chung được chia thành bốn họ: (1) axit--aspartat và glutamat; (2) bazơ--lysin, arginin, histidin; (3) không phân cực--alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, metionin, tryptophan; và (4) phân cực không tích điện--glyxin, asparagin, glutamin, xystin, serin, threonin, tyrosin. Phenylalanin, tryptophan, và tyrosin đôi khi được phân loại là các axit amin thơm. Ví dụ về các biến đổi bảo toàn bao gồm sự thay thế một gốc kỵ nước như isoleuxin, valin, leuxin hoặc metionin cho một gốc kỵ nước khác, hoặc sự thay thế một gốc phân cực cho một gốc phân cực khác, như sự thay thế arginin cho lysin, axit glutamic cho axit aspartic, hoặc glutamin cho asparagin, và các thay thế tương tự; hoặc sự thay thế bảo toàn tương tự của axit amin bằng axit amin liên quan về cấu trúc mà sẽ không ảnh hưởng chủ yếu đến hoạt tính sinh học. Các protein có trình tự axit amin gần giống như phân tử đối chiếu nhưng có sự thay thế axit amin nhỏ không ảnh hưởng đáng kể đến khả năng sinh miễn dịch của protein là, do đó, thuộc định nghĩa của polypeptit đối chiếu. Tất cả các polypeptit được tạo ra bởi các cải biến này là được bao gồm trong bản mô tả này. Thuật ngữ "sự biến đổi bảo toàn" cũng bao gồm việc sử dụng axit amin được thế thay cho axit amin gốc không được thế miễn là các kháng thể được sinh ra bởi polypeptit được thế cũng phản ứng miễn dịch với polypeptit không được thế.

Thuật ngữ "epitop" được dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên hoặc hapten mà tế bào B và/hoặc tế bào T đặc hiệu đáp ứng với. Thuật ngữ này cũng

được sử dụng thay thế cho "yếu tố quyết định kháng nguyên" hoặc "vị trí yếu tố quyết định kháng nguyên". Các kháng thể nhận biết cùng một epitop có thể được nhận diện trong thử nghiệm miễn dịch đơn giản thể hiện khả năng của một kháng thể phong bế gắn kết của một kháng thể khác với kháng nguyên đích.

"Đáp ứng miễn dịch" với chế phẩm hoặc vaccin là quá trình trong vật chủ có đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào và/hoặc kháng thể với chế phẩm hoặc vaccin cần quan tâm. Thông thường, "đáp ứng miễn dịch" bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, một hoặc nhiều tác động sau: sản sinh kháng thể, tế bào B, tế bào T hỗ trợ, và/hoặc tế bào T độc, hướng đặc hiệu đến kháng nguyên hoặc các kháng nguyên được bao gồm trong chế phẩm hoặc vaccin cần quan tâm. Tốt hơn là, vật chủ sẽ biểu hiện đáp ứng miễn dịch trị liệu hoặc bảo vệ sao cho tính kháng với việc nhiễm mới sẽ được tăng cường và/hoặc mức độ nghiêm trọng lâm sàng của bệnh được làm giảm. Sự bảo vệ này sẽ được minh họa bởi việc giảm hoặc mất các triệu chứng và/hoặc dấu hiệu bệnh lâm sàng thường được biểu hiện bởi vật chủ bị nhiễm, thời gian hồi phục nhanh hơn và/hoặc hiệu giá virus được giảm trong vật chủ bị nhiễm.

"Động vật" được dự định bao gồm động vật có vú, chim, và các loài tương tự. Động vật hoặc vật chủ được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm động vật có vú và người. Động vật này có thể được chọn từ nhóm bao gồm loài ngựa (ví dụ, ngựa), loài chó (ví dụ, chó, chó sói, cáo, chó sói đồng cỏ, chó rừng), loài mèo (ví dụ, sư tử, hổ, mèo nuôi trong nhà, mèo hoang, mèo lớn khác, và các loài mèo khác bao gồm báo ghepa và mèo rừng), loài cừu (ví dụ, cừu), loài bò (ví dụ, gia súc), loài lợn (ví dụ, lợn), loài chim (ví dụ, gà, vịt, ngỗng, gà tây, chim cút, gà lôi, vịt, chim họ sẻ, điều hâu, quạ, đà điểu châu Phi, đà điểu sa mạc Úc và đà điểu đầu mèo), động vật linh trưởng (ví dụ, bộ bán hầu, phủ hầu, khỉ, vượn, khỉ không đuôi), chồn sương, chó biển, và cá. Thuật ngữ "động vật" còn bao gồm động vật riêng ở tất cả các giai đoạn phát triển, bao gồm các giai đoạn mới sinh, phôi và thai.

Trừ khi được giải thích khác, tất cả các thuật ngữ kỹ thuật và khoa học được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa giống như thường được hiểu bởi người có hiểu biết có trình độ trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế này thuộc về. Các thuật ngữ dạng số ít "một" ("a", "an", và "the" trong bản mô tả tiếng Anh) cũng bao gồm cả dạng số nhiều trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ khác. Tương tự, từ "hoặc" được dự định bao gồm "và" trừ khi ngữ cảnh chỉ rõ khác.

Lưu ý rằng trong sáng chế này và đặc biệt là trong yêu cầu bảo hộ và/hoặc các đoạn, các thuật ngữ như "gồm có", "được bao gồm", "bao gồm" và

các thuật ngữ tương tự có thể có nghĩa như được quy định trong luật patent Mỹ; ví dụ, chúng có thể có nghĩa “gồm cả”, “được gồm cả”, “kể cả”, và các nghĩa tương tự; và các thuật ngữ như “về cơ bản được cấu thành từ” và “về cơ bản gồm có” có nghĩa như được quy định trong luật patent Mỹ, ví dụ, chúng cho phép các phần tử không cần trích dẫn cụ thể, nhưng loại trừ các phần tử được tìm thấy trong giải pháp kỹ thuật đã biết hoặc ảnh hưởng đến tính cơ bản hoặc mới của sáng chế.

Chế phẩm

Sáng chế đề xuất vaccin hoặc chế phẩm *S. suis* có thể chứa chủng *S. suis* nhược độc và chất mang, tá dược, hoặc chất dẫn thuốc được dụng hoặc dùng trong thú y, gây ra, sinh hoặc kích thích đáp ứng ở động vật.

Thuật ngữ “axit nucleic” và “polynucleotit” được dùng để chỉ ARN hoặc ADN có mạch thẳng hoặc phân nhánh, sợi đơn hoặc kép, hoặc thể lai của chúng. Thuật ngữ này cũng bao gồm thể lai ARN/ADN. Sau đây là các ví dụ không nhằm mục đích giới hạn về các polynucleotit: gen hoặc mảnh gen, exon, intron, mARN, tARN, rARN, ribozym, ADN bổ trợ, polynucleotit tái tổ hợp, polynucleotit phân nhánh, plasmit, vector, ADN được phân lập có trình tự bất kỳ, ARN được phân lập có trình tự bất kỳ, mẫu dò và đoạn môi của axit nucleic. Polynucleotit có thể bao gồm các nucleotit được cải biến, như nucleotit được metyl hóa và chất tương tự nucleotit, uracyl, các đường khác và các nhóm liên kết như floribose và thiolat, và các nhánh nucleotit. Trình tự của các nucleotit có thể được cải biến tiếp sau khi polyme hoá, như bằng cách liên hợp, với thành phần đánh dấu. Các loại cải biến khác được bao gồm trong định nghĩa này là gắn mũ, thay thế một hoặc nhiều nucleotit có trong tự nhiên bằng chất tương tự, và đưa bằng cách nào đó để gắn polynucleotit với các protein, ion kim loại, thành phần đánh dấu, polynucleotit hoặc giá thể rắn. Các polynucleotit này có thể thu được bằng cách tổng hợp hoá học hoặc có nguồn gốc từ vi sinh vật.

Thuật ngữ “gen” được sử dụng rộng rãi để chỉ đoạn polynucleotit bất kỳ liên quan đến chức năng sinh học. Do đó, các gen bao gồm các intron và exon như trong trình tự hệ gen, hoặc chỉ là trình tự mã hóa như trong các ADN bổ trợ và/hoặc trình tự điều hòa cần thiết cho sự biểu hiện của chúng. Ví dụ, gen cũng được dùng để chỉ mảnh axit nucleic biểu hiện ARN thông tin hoặc ARN chức năng, hoặc mã hóa protein đặc hiệu, và bao gồm các trình tự điều hòa.

Thành phần sinh học “được phân lập” (như axit nucleic hoặc protein hoặc bào quan) được dùng để chỉ thành phần đã được tách hoặc tinh chế gần

hết khỏi các thành phần sinh học khác trong tế bào của sinh vật trong đó thành phần này có tự nhiên, ví dụ, ADN và ARN nhiễm sắc thể và ngoài nhiễm sắc thể khác, protein, và bào quan. Axit nucleic và protein đã “được phân lập” bao gồm axit nucleic và protein được tinh chế bằng các phương pháp tinh chế chuẩn. Thuật ngữ này cũng bao hàm các axit nucleic và các protein được tạo ra bằng công nghệ tái tổ hợp cũng như tổng hợp hoá học.

Thuật ngữ "sự biến đổi bảo toàn" chỉ sự thay thế gốc axit amin bằng một gốc khác tương tự về mặt sinh học, hoặc sự thay thế nucleotit trong trình tự axit nucleic sao cho gốc axit amin được mã hóa không thay đổi hoặc là một gốc khác tương tự về mặt sinh học. Về mặt này, sự thay thế được đặc biệt ưu tiên thường sẽ được bảo toàn trong tự nhiên, như đã mô tả trên đây.

Thuật ngữ “tái tổ hợp” có nghĩa là polynucleotit có nguồn gốc bán tổng hợp, hoặc tổng hợp không có trong tự nhiên hoặc được gắn kết với một polynucleotit khác theo cấu trúc không tìm thấy được trong tự nhiên.

“Dị loại” có nghĩa là phần tử có nguồn gốc từ thực thể khác biệt về mặt di truyền so với phần còn lại của thực thể mà nó được so sánh. Ví dụ, polynucleotit có thể được đưa vào plasmid hoặc vector có nguồn gốc từ nguồn khác bằng kỹ thuật xử lý di truyền, và là polynucleotit dị loại. Trình tự khởi động được tách khỏi trình tự mã hóa nguyên thể của nó và được liên kết có điều khiển với trình tự mã hóa khác trình tự nguyên thể là trình tự khởi động dị loại.

Các polynucleotit theo sáng chế có thể bao gồm các trình tự bổ sung, như các trình tự mã hóa bổ sung trong cùng đơn vị phiên mã, các yếu tố điều khiển như trình tự khởi động, vị trí gắn kết ribosom, 5'UTR, 3'UTR, vùng kết thúc phiên mã, vị trí polyadenyl hóa, đơn vị phiên mã bổ sung dưới sự điều khiển của trình tự khởi động cùng hoặc khác, các trình tự cho phép tách dòng, biểu hiện, tái tổ hợp tương đồng, và biến nạp của tế bào chủ, và cấu trúc như vậy bất kỳ như có thể mong muốn để đề xuất các phương án của sáng chế.

Phương pháp sử dụng và vật phẩm sản xuất

Sáng chế bao gồm các phương án về phương pháp sau. Theo một phương án, sáng chế mô tả phương pháp chủng ngừa động vật bao gồm bước cho động vật này dùng chế phẩm chứa chủng *S. suis* nhược độc và chất mang, tá dược, hoặc chất dẫn thuốc được dụng hoặc dùng trong thú y. Theo một khía cạnh của phương án này, động vật này là lợn.

Theo một phương án của sáng chế, chế độ tiêm chủng nhắc lại có thể được dùng, chế độ này bao gồm ít nhất một lần dùng cơ bản và ít nhất một lần

dùng nhắc lại bằng cách sử dụng ít nhất một polypeptit, kháng nguyên, epitop hoặc chất kháng nguyên thông thường. Thông thường, chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin được sử dụng trong lần dùng cơ bản về bản chất là khác với chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin được sử dụng để nhắc lại. Tuy nhiên, lưu ý rằng chế phẩm giống nhau có thể được sử dụng trong lần dùng cơ bản và lần dùng nhắc lại. Quy trình dùng này được gọi là “tiêm chủng nhắc lại”.

Chế độ tiêm chủng nhắc lại bao gồm ít nhất một lần dùng cơ bản và ít nhất một lần dùng nhắc lại bằng cách sử dụng ít nhất một polypeptit thông thường và/hoặc các biến thể hoặc của chúng. Vaccin được sử dụng trong lần dùng cơ bản có thể khác về bản chất với vaccin được sử dụng làm vaccin nhắc lại sau đó. Lần dùng cơ bản có thể bao gồm một hoặc nhiều lần dùng. Tương tự, lần dùng nhắc lại có thể bao gồm một hoặc nhiều lần dùng.

Thể tích liều của chế phẩm đối với loài đích là động vật có vú, ví dụ, thể tích liều của chế phẩm dùng cho lợn hoặc loài lợn, tính theo kháng nguyên vi khuẩn, thường nằm trong khoảng từ 0,1 đến 2,0 ml, nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1,0 ml, và nằm trong khoảng từ 0,5 ml đến 1,0 ml.

Hiệu lực của vaccin có thể được kiểm tra ở khoảng 2 đến 4 tuần sau lần chủng ngừa cuối cùng bằng cách thử nghiệm gây nhiễm động vật, như loài lợn, bằng chủng *S. suis* có tính độc. Cả hai chủng đồng loại và dị loại được sử dụng để gây nhiễm để thử nghiệm hiệu lực của vaccin. Động vật này có thể được gây nhiễm bằng cách tiêm IM (trong cơ) hoặc SC (dưới da), phun xịt trong mũi, trong mắt, trong khí quản, và/hoặc qua đường miệng. Các mẫu từ các khớp, phổi, não, và/hoặc miệng có thể được thu trước và sau khi gây nhiễm và có thể được phân tích sự có mặt của kháng thể đặc hiệu *S. suis*.

Các chế phẩm chứa chủng vi khuẩn nhược độc theo sáng chế được sử dụng trong quy trình tiêm chủng nhắc lại là chứa chất dẫn thuốc, chất pha loãng hoặc tá dược được dùng hoặc dùng trong thú y. Các quy trình theo sáng chế bảo vệ động vật khỏi *S. suis* và/hoặc phòng ngừa tiến triển của bệnh ở động vật bị nhiễm.

Các lần dùng khác nhau tốt hơn là được thực hiện cách nhau từ 1 đến 6 tuần. Khoảng thời gian được ưu tiên là từ 3 đến 5 tuần, và tối ưu là 4 tuần theo một phương án, việc nhắc lại hàng năm cũng được dự tính. Các động vật, ví dụ, lợn, có thể ít nhất 3-4 tuần tuổi tại thời điểm dùng đầu tiên.

Người có hiểu biết trong lĩnh vực này cần hiểu rằng sáng chế trong bản mô tả này được đưa ra bằng các ví dụ và sáng chế này không bị giới hạn ở đó. Từ bộc lộ trong bản mô tả này và hiểu biết trong lĩnh vực, người có hiểu biết

trong lĩnh vực này có thể xác định số lần dùng, đường dùng, và các liều được sử dụng cho mỗi quy trình tiêm, mà không cần thử nghiệm quá mức bất kỳ.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kit để thực hiện phương pháp gây ra hoặc sinh đáp ứng miễn dịch hoặc bảo vệ chống *S. suis* ở động vật bao gồm chế phẩm miễn dịch hoặc vaccin *S. suis* nhược độc và hướng dẫn để thực hiện phương pháp phân phối một lượng hữu hiệu để gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kit để thực hiện phương pháp gây đáp ứng miễn dịch hoặc bảo vệ chống *S. suis* ở động vật bao gồm chế phẩm hoặc vaccin chứa chủng *S. suis* nhược độc theo sáng chế, và hướng dẫn để thực hiện phương pháp phân phối một lượng hữu hiệu để gây ra đáp ứng miễn dịch ở động vật.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến kit để chủng ngừa nhắc lại theo sáng chế như đã mô tả trên đây. Kit này có thể bao gồm ít nhất hai lọ: lọ thứ nhất chứa vaccin hoặc chế phẩm để chủng ngừa cơ bản theo sáng chế, và lọ thứ hai chứa vaccin hoặc chế phẩm để chủng ngừa nhắc lại theo sáng chế. Kit này có thể chứa một cách thuận lợi lọ bổ sung thứ nhất hoặc thứ hai để chủng ngừa cơ bản bổ sung hoặc chủng ngừa nhắc lại bổ sung.

Các chất mang hoặc chất dẫn thuốc hoặc tá dược được dùng hoặc dùng trong thú y là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, chất mang hoặc chất dẫn thuốc hoặc tá dược được dùng hoặc dùng trong thú y có thể là dung dịch NaCl 0,9% (ví dụ, nước muối sinh lý) hoặc dung dịch đệm phosphat. Chất mang hoặc chất dẫn thuốc hoặc tá dược được dùng hoặc dùng trong thú y khác mà có thể được sử dụng trong phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, poly-(L-glutamat) hoặc polyvinylpyrrolidon. Chất mang hoặc chất dẫn thuốc hoặc tá dược được dùng hoặc dùng trong thú y có thể là hợp chất bất kỳ hoặc tổ hợp các hợp chất tạo thuận lợi cho việc dùng vector (hoặc protein được biểu hiện từ vector theo sáng chế *in vitro*); một cách thuận lợi, chất mang, chất dẫn thuốc hoặc tá dược này có thể tạo thuận lợi cho việc chuyển nhiễm và/hoặc cải thiện việc bảo quản vector (hoặc protein). Các liều và thể tích liều được bàn luận trong bản mô tả này trong phần mô tả chung và cũng có thể được xác định bởi người có hiểu biết trong lĩnh vực khi việc đọc bản mô tả này kết hợp với hiểu biết trong lĩnh vực, mà không cần thử nghiệm quá mức bất kỳ.

Các chế phẩm miễn dịch và vaccin theo sáng chế có thể bao gồm hoặc về cơ bản bao gồm một hoặc nhiều tá chất. Các tá chất thích hợp để sử dụng trong thực hiện sáng chế là (1) polyme của axit acrylic hoặc metacrylic,

anhydrit maleic và các polyme dẫn xuất alkenyl, (2) các trình tự kích thích miễn dịch (immunostimulating sequence - ISS), như trình tự oligodeoxyribonucleotit có một hoặc nhiều đơn vị CpG không được metyl hóa (Klinman et al., 1996; WO98/16247), (3) nhũ tương dầu trong nước, như nhũ tương SPT được mô tả ở trang 147 của “Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach” được công bố bởi M. Powell, M. Newman, Plenum Press 1995, và nhũ tương MF59 được mô tả ở trang 183 của cùng tài liệu này, (4) lipid cation chứa muối amoni bậc bốn, ví dụ, DDA (5) xytokin, (6) nhôm hydroxit hoặc nhôm phosphat, (7) saponin hoặc (8) các tá chất khác được bàn luận trong tài liệu bất kỳ được trích dẫn và được hợp nhất bằng cách viện dẫn vào bản mô tả này, hoặc (9) tổ hợp hoặc hỗn hợp bất kỳ của các chất này.

Theo một phương án, các tá chất bao gồm các chất thúc đẩy sự hấp thu cải thiện qua lớp niêm mạc. Một số ví dụ bao gồm MPL, LTK63, các độc tố, các vi hạt PLG và một số chất khác (Vajdy, M. Immunology and Cell Biology (2004) 82, 617–627). Theo một phương án, tá chất này có thể là chitosan (Van der Lubben và các đồng tác giả 2001; Patel và các đồng tác giả 2005; Majithiya và các đồng tác giả 2008; patent Mỹ số 5,980,912).

Theo một phương án, tá chất này có thể là vi khuẩn đã được làm bất hoạt, virus đã được làm bất hoạt, các phần của vi khuẩn đã được làm bất hoạt, lipopolysaccarit của vi khuẩn, các độc tố của vi khuẩn, hoặc các dẫn xuất hoặc tổ hợp của chúng.

Theo một phương án, tá chất này bao gồm vi khuẩn và/hoặc virus nguyên vẹn, bao gồm *H. parasuis*, clostridium, virus gây suy giảm miễn dịch ở lợn (swine immunodeficiency virus - SIV), circovirus ở lợn (porcine circovirus - PCV), virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (porcine reproductive and respiratory syndrome virus - PRRSV), Mannheimia, Pasteurella, Histophilus, Salmonella, *Escherichia coli*, hoặc tổ hợp và/hoặc biến thể của chúng. Theo một số phương án, tá chất này làm tăng mức sản sinh IgM, IgG, IgA, và/hoặc tổ hợp của chúng ở động vật.

Tài liệu tham khảo:

1. Allgaier, A., et al. 2001. Relatedness of *Streptococcus suis* isolates of various serotypes and clinical backgrounds as evaluated by macrorestriction analysis and expression of potential virulence traits. J. Clin. Microbiol. 39, 445-453.
2. Baums, C. G. , et al., 2006. Identification of a novel virulence determinant with serum opacification activity in *Streptococcus suis*. Infect.

Immun. 74, 6154-6162.

3. Baums, C.G., et al., 2009. *Streptococcus suis* bacterin and subunit vaccine immunogenicities and protective efficacies against serotypes 2 and 9. Clin Vaccine Immunol. 2, 200-208.

4. Berthelot-Herault, F., et al., 2005. Dilemma of virulence of *Streptococcus suis*: Canadian isolate 89-1591 characterized as a virulent strain using a standardized experimental model in pigs. Can. J. Vet. Res. 69, 236-240.

5. Chabot-Roy, G. et al., 2006. Phagocytosis and killing of *Streptococcus suis* by porcine neutrophils. Microb. Pathog. 41, 21-32.

6. Davidson A.L., et al., 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems". Microbiol. Mol. Biol. Rev. 72, 317-364.

7. Davidson A.L., Chen J., 2004. ATP-binding cassette transporters in bacteria". Annu. Rev. Biochem 73, 241-268.

8. de Greeff, A., et al., 2002. Contribution of fibronectin-binding protein to pathogenesis of *Streptococcus suis* serotype 2. Infect. Immun. 70, 1319-1325.

9. Fittipaldi, N. et al., 2008a. Significant contribution of the pgdA gene to the virulence of *Streptococcus suis*. Mol. Microbiol. 78, 1120-1135.

10. Fittipaldi, N. et al., 2008b. D-Alanylation of lipoteichoic acid contributes to the virulence of *Streptococcus suis*. Infect. Immun. 76, 3587-3594.

11. Fittipaldi, N. et al., 2011. Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from North America. Emerg Infect Dis. 12, 2239-2244.

12. Gottschalk, M. et al., 2007. *Streptococcus suis* infections in humans: the Chinese experience and the situation in North America. Anim. Health Res. Rev. 8, 29-45.

13. Henderson D.P., Payne, S.M., 1994. Vibrio cholerae iron transport system: roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems". Infect. Immun 62, 5120-5125.

14. Higgins, R., Gottschalk, M., 2006. Streptococcal diseases. In: Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine. Blackwell Publishing, pp. 769-783.

15. Jacobs, A., et al., 1996. Protection of experimentally infected pigs by sulysin, the thiol-activated hemolysin of *Streptococcus suis*. Vet. Rec. 139, 225-228.

16. Li, Y., et al., 2007. Immunization with recombinant Sao protein confers protection against streptococcus suis infection. Clin. Vaccine Immunol. 14, 937-943.
17. McEvoy, G.K., editor. 1989. AHFS Drug information 89. Bethesda, MD: American Society of Hospital Pharmacists, 1925-1927.
18. Perch, B., et al., 1968. Group R streptococci pathogenic for man. Two cases of meningitis and one fatal case of sepsis. Acta Pathol Microbiol Scand 74, 69-76.
19. Poole, R.K., et al., 1994. The cydD gene product, component of a heterodimeric ABC transporter, is required for assembly of periplasmic cytochrome-c and of cytochrome-bd in Escherichia coli". FEMS Microbiol. Lett. 117, 217-224.
20. Poolman, B., et al., 2004. Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions". Biochim. Biophys. Acta 1666, 88-104.
21. Quessy, S., et al., 1995. Discrimination of virulent and avirulent *Streptococcus suis* capsular type 2 isolates from different geographical origins. Infect. Immun. 63, 1975-1979.
22. Smith, H.E., et al., 1999. Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. Infect. Immun. 67, 1750-1756.
23. Sinha, R.P., 1977. Acriflavine-Resistant Mutant of *Streptococcus cremoris*. Antimicro and Chemo 12, 383-389.
24. Vecht, U. et al., 1991. Identification of two proteins associated with virulence of *Streptococcus suis* type 2. Infect. Immun. 59, 3156-3162.
25. Vecht, U. et al., 1992. Virulence of *Streptococcus suis* type 2 strains in newborn germfree pigs depends on phenotype. Infect. Immun. 60, 550-556.
26. Wisselink, H. J., et al., 2002. Assessment of protective efficacy of live and killed vaccines based on a non-encapsulated mutant of *Streptococcus suis* serotype 2. Vet. Microbiol. 84, 155-168.
27. Zhou, Z.M., et al., 1998. Function of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis". J. Biol. Chem. 273, 12466-12475.
28. George, A. M., and S. B. Levy. 1983. Gene in the major cotransduction gap of the Escherichia coli K-12 linkage map required for the expression of chromosomal resistance to tetracycline and other antibiotics. J.

Bacteriol. 155:541–548.

Dưới đây sáng chế sẽ được mô tả thêm bằng các ví dụ không mang tính giới hạn sau.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1 – Tạo ra và phân tích hệ gen của *S. suis* nhược độc

Để phát triển vaccin bảo vệ rộng chống nhiễm *S. suis*, chủng thực địa ở Mỹ (chủng gốc, Newport Laboratories số 8-1433-1, SEQ ID NO:9) được phân lập từ miếng gạc thấm não của loài lợn. Thể phân lập này được nhận diện là *S. suis* kiểu huyết thanh 2, dựa trên các phản ứng sinh hóa và thử nghiệm ngưng kết. Việc làm giảm độc lực của chủng gốc này được thực hiện bằng cách gây đột biến hóa học bằng cách sử dụng acriflavin hydroclorua, như được mô tả bởi Sinha và các đồng tác giả. Nói ngắn gọn, các tế bào gốc *S. suis* được phát triển trong 18 giờ trong canh thang đậu nành trypticase chứa 5% máu cừu được bổ sung 10 μ M/ml acriflavin hydroclorua. Các tế bào sống sót được tách lần nữa trên đĩa thạch máu cừu. Hai mươi khuẩn lạc riêng rẽ được chọn và được phát triển riêng rẽ trong môi trường lỏng giống nhau. Một môi trường nuôi cấy trong số 20 môi trường được chọn và tiêm ($1,76 \times 10^9$ tế bào/ml) vào lợn để xác định độc lực. Mười con lợn được gây nhiễm, qua đường miệng, và được quan sát trong 26 ngày. Các dấu hiệu lâm sàng phù hợp với việc nhiễm *S. suis* không được quan sát trong khoảng thời gian này. Ngoài nhược độc cao, chủng đột biến này kháng với neomycin. Ngoài ra, toàn bộ hệ gen của chủng vaccin đột biến/dự tuyển (SEQ ID NO:10), cũng như chủng gốc (SEQ ID NO:9), được giải trình tự đầy đủ và được phân tích điểm đa hình đơn nucleotit (single nucleotide polymorphism - SNP) mà có thể đem lại kiểu hình không có độc lực.

Giải trình tự. Để giải trình tự hệ gen của các chủng gốc và chủng đột biến, môi trường nuôi cấy pha log của *S. suis* được tạo hạt và ADN được tinh chế bằng cách sử dụng kit mini Qiagen DNA (Qiagen, Valencia, CA). Sau đó, thư viện ADN hệ gen được tạo ra (Illumina Genomic DNA Prep Kit, Illumina, San Diego, CA), và được đem khuếch đại nhóm trên Single End Flow Cell v4 bằng dụng cụ Cluster Generation Station (Illumina) để tạo ra cường độ nhóm chưa xử lý bằng ~ 600.000 mm². Việc giải trình tự được thực hiện trên máy phân tích hệ gen GAI trong 56 chu kỳ bằng cách sử dụng chất phản ứng của kit giải trình tự (Illumina). Sau đó, các trình tự được so sánh với trình tự hệ gen của *S. suis* P1/7 được lấy từ ngân hàng gen, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AM946016.1>) (SEQ ID NO:11), và độ

tương đồng được xác định bằng các gen xác định đã biết. Các trình tự của cả hai chủng gốc và đột biến được so sánh để tìm kiếm điểm đa hình đơn nucleotit (SNP) xảy ra trong các vùng mã hoá của các gen (mặc dù các tác giả sáng chế đã thừa nhận và dự tính các vùng không mã hóa cũng có thể đảm nhiệm về kiểu hình nhược độc/không có độc lực). Phân tích này phát hiện ra một số SNP và một số SNP dẫn đến các thay đổi axit amin (không đồng nghĩa) được đem kiểm tra tiếp. Các SNP dẫn đến sự thay đổi axit amin được kiểm tra bằng cách sử dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger theo các quy trình đã biết.

Các đoạn đọc được lọc chất lượng bằng cách sử dụng tập lệnh Python tùy chỉnh. Các bazơ chất lượng thấp đầu tiên được cắt bớt khỏi đầu của đoạn đọc, sau đó, chúng chỉ được giữ lại nếu có ít nhất 40bp có chất lượng > 20 và chắc chắn được gọi là các bazơ nội. Sau bước cắt bớt và lọc, các đoạn đọc được vẽ bản đồ đối với tập hợp hệ gen đối chiếu bằng cách sử dụng Burrows-Wheeler Aligner (BWA) phiên bản 0.6.1-r104 (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Đầu ra bắt cặp trình tự/bản đồ (Sequence Alignment/Map - SAM) của BWA sau đó được phân tích tiếp bằng gói SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) để gọi các biến thể. Sau đó, việc gọi biến thể thu được được phân tích tiếp bằng tập lệnh tùy chỉnh được viết ở dạng R trong đó các biến thể được chú thích dựa trên vị trí của chúng trong hệ gen. Các biến thể cũng được lọc dựa trên độ sâu bảo vệ, chất lượng kiểu gen được báo cáo bởi SAMtools, và đối với các biến thể tách riêng với các mẫu từ gốc và thể đột biến. SAMtools cũng được sử dụng để tạo ra các trình tự liên ứng dựa trên các kết quả vẽ bản đồ. Trình tự này được chú thích dựa trên trình tự tham chiếu và được định dạng thành tệp tin của Ngân hàng gen để tương thích Artemis bằng cách sử dụng các tập lệnh tùy chỉnh và BioPython (<http://biopython.org/wiki/Biopython>). Việc so sánh các hệ gen giữa gốc và thể đột biến (vacxin) dẫn đến 3 SNP kéo dài qua hai gen; 1) Hai SNP trong protein tiểu đơn vị ribosom 30S rpsL-S12 và 2) Một SNP trong protein màng gắn kết ATP vận chuyển ABC. Ba SNP này được xác nhận bằng phương pháp giải trình tự Sanger chuẩn.

Tầm quan trọng chức năng của protein tiểu đơn vị ribosom 30S rpsL-S12: Các protein tiểu đơn vị 30S nhỏ (S) và các protein tiểu đơn vị 50S lớn (L) là các thành phần có tính quyết định của bộ máy tổng hợp protein. Các protein tiểu đơn vị này có chức năng làm vị trí gắn kết cho nhiều thuốc kháng sinh và các đột biến trong bất kỳ một/nhiều trong số các protein tiểu đơn vị này dẫn đến tính kháng hoặc tính nhạy cảm với thuốc kháng sinh. Các đột biến gây ra bởi điểm đa hình đơn nucleotit (SNP) trong tiểu đơn vị nhỏ hơn đem lại tính

kháng thuốc kháng sinh như tetracycline, spectinomycin, hygromycin B và streptomycin, còn các đột biến trong tiểu đơn vị lớn hơn đem lại tính kháng với chloramphenicol, erythromycin, và streptogramin B. Chủng vacxin *S. suis* kháng với neomycin (16 µg/ml) là kết quả của hai SNP này trong protein tiểu đơn vị ribosom nhỏ (S12) và có kiểu hình không có độc lực. Ở vi khuẩn kiểu dại, neomycin được vận chuyển tích cực qua màng tế bào vi khuẩn, gắn với protein thụ thể đặc hiệu trên tiểu đơn vị 30S của ribosom vi khuẩn, và cản trở phức hợp khởi đầu giữa mARN (ARN thông tin) và tiểu đơn vị 30S, ức chế tổng hợp protein. ADN có thể được đọc sai, do đó, tạo ra các protein không có chức năng; các polyribosom bị tách riêng ra và không thể tổng hợp protein [McEvoy, 1989].

Tầm quan trọng chức năng của protein màng gắn kết ATP vận chuyển ABC: Chất vận chuyển dạng băng gắn kết ATP (ATP-binding cassette transporter - ABC-chất vận chuyển) của vi khuẩn là cần thiết cho sự sống của tế bào và để vận chuyển các yếu tố độc lực hoặc liên quan đến độc lực [Davidson và các đồng tác giả, 2008; Henderson và các đồng tác giả, 1994]. Chất vận chuyển ABC là cực kì quan trọng đối với sự sống của tế bào và chúng có chức năng như các chất bảo vệ thẩm thấu bằng cách làm trung gian hấp thu các chất hòa tan và ngăn ngừa sự tăng nồng độ thẩm thấu gây chết [Poolman và các đồng tác giả, 2004]. Ngoài ra, các protein ABC của vi khuẩn cũng tham gia trong việc điều hòa một số các quy trình sinh lý. Các chất vận chuyển ABC cũng có tác dụng trong hệ thống đẩy của vi khuẩn bằng cách đẩy các thành phần ra bề mặt tế bào (ví dụ, polysacarit vỏ, lipopolysacarit, và axit teichoic), các protein liên quan đến sinh bệnh học của vi khuẩn (ví dụ, tan máu, protein gắn kết heme, và proteaza kiềm), heme, các enzym thủy phân, các protein lớp S, nhân tổ dung nạp, độc tố, thuốc kháng sinh, bacteriocin, thuốc kháng sinh peptit, thuốc và các thể mang sắt [Davidson và các đồng tác giả, 2008; Davidson and Chen, 2004]. Chúng cũng đóng vai trò quan trọng trong các quá trình sinh tổng hợp, bao gồm sinh tổng hợp polysacarit ngoại bào và phát sinh sinh vật cytochrom [Zhou và các đồng tác giả, 1998; Poole và các đồng tác giả, 1994].

Tầm quan trọng chức năng của trình tự điều hòa phiên mã marR. Việc phân tích miền được bảo tồn NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?RID=WWP257HN01N&mode=all>) cho thấy rằng gen này mã hóa trình tự điều hòa phiên mã chứa môtip “xoắn-vòng-xoắn” liên quan đến tính kháng nhiều thuốc kháng sinh (HTH_MARR), một phần của operon *marRAB*. Ở *Escherichia coli*, *marA* mã

hóa trình tự điều hòa dương tính của đáp ứng kháng thuốc kháng sinh, còn *marR* mã hóa chất kìm hãm sự phiên mã *marRAB* và kiểm soát việc sản sinh MarA trong đáp ứng với các tín hiệu môi trường (George and Levy, 1983). SNP trong chủng vacxin được bộc lộ nằm trong miền HTH_MARR (các vị trí axit amin từ 30 đến 125). Miền xoắn-vòng-xoắn gắn với ADN và là dấu hiệu xác nhận tiêu chuẩn của trình tự điều hòa phiên mã. Protein MarR kiểu đại là dimer có mỗi tiểu đơn vị chứa môtip gắn ADN xoắn có tay liên quan đến việc điều hòa phiên mã.

Đồng thời, các đột biến trong ba gen này (các SNP được tóm tắt trong bảng 1) tạo ra chủng vacxin *S. suis* NPL không có độc lực và kháng neomycin, và có thể kháng các thuốc kháng sinh khác.

Bảng 1. Vị trí của các SNP và nhận diện các gen được gây đột biến trong chủng *S. suis* nhược độc

Gen	SNP #	Vị trí nucleotit	Chủng gốc	Chủng vacxin	Sự thay đổi axit amin
rpsL-S12	1	167	A (được tìm thấy trong SEQ ID NO:1)	C (được tìm thấy trong SEQ ID NO:3)	Lysin thành Threonin (K-T)
rpsL-S12	2	301	A (được tìm thấy trong SEQ ID NO:1)	C (được tìm thấy trong SEQ ID NO:3)	Lysin thành glutamin (K-Q)
Protein màng gắn kết ATP vận chuyển ABC	3	323	G (được tìm thấy trong SEQ ID NO:5)	A (được tìm thấy trong SEQ ID NO:7)	Arginin thành Histidin (R-H)
Trình tự điều hòa phiên mã <i>marR</i>	4	265	C (được tìm thấy trong SEQ ID NO:9)	T (được tìm thấy trong SEQ ID NO:11)	Arginin thành Xystein (R-C)

Ví dụ 2 – Hiệu lực của vacxin *S. suis* nhược độc ở loài lợn

Quy trình chung để nghiên cứu hiệu lực: Đơn vị tạo khuẩn lạc (Colony forming unit - CFU) trên mililit của mỗi dịch vacxin pha loãng được xác định thông qua hiệu giá trước và sau khi chủng ngừa.

Tất cả các con lợn được tuyển chọn vào nghiên cứu này được thu từ Midwest Research Swine, Gibbon, MN, và khỏe mạnh và bình thường tại thời điểm phân phối. Đàn lợn này được coi là đàn giống có sức khỏe tốt, không có

tiền sử nhiễm *Streptococcus suis* và âm tính với virus gây hội chứng sinh sản và hô hấp ở lợn (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus - PRRSV). Đàn lợn con giống này có tiền sử miễn cảm với việc gây nhiễm *S. suis* trong các nghiên cứu trước đó. Các con lợn được nhận lúc 17-24 ngày tuổi. Các con lợn được quan sát trước khi chủng ngừa và được cho là bình thường về mặt lâm sàng do chúng không có các dấu hiệu của bệnh, bao gồm ho, thở bụng, và/hoặc què chân. Các con lợn riêng được sử dụng làm đơn vị thử nghiệm trong nghiên cứu này và tai được gắn nhãn trước khi phân phối. Các con lợn được định ngẫu nhiên vào các chuồng và vào các nhóm điều trị bằng cách sử dụng chức năng phát số ngẫu nhiên trong Microsoft Excel.

Phác đồ của các biến cố. Tất cả các con lợn được chủng ngừa vào ngày 0. Mỗi con lợn trong nhóm dùng vacxin được nhận 1 ml vacxin thích hợp, qua đường miệng. Các con lợn đối chứng được dùng 1 ml nước muối vô trùng, qua đường miệng, dùng làm giả dược. Khoảng 30-35 ngày sau khi chủng ngừa, tất cả các con lợn được gây nhiễm và được quan sát trong mười một ngày sau khi gây nhiễm.

Gây nhiễm. Thể phân lập được gây nhiễm là từ mẫu gạc thối não (thể phân lập 8-1433-1). Thể phân lập này được nhận diện là thể phân lập *Streptococcus suis* typ 2 thông qua sự xuất hiện khuẩn lạc trên đĩa thạch máu (các khuẩn lạc nhỏ, màu trắng, mượt, tròn), phản ứng nhuộm gram, thử nghiệm sinh hóa (tan máu alpha, catalaza âm tính, không sinh trưởng trong môi trường canh chứa 6,5% natri clorua, và esculin dương tính). Thể phân lập này được phát triển đến khoảng 9 log/ml trong môi trường nuôi cấy lỏng, đông lạnh trong phần mẫu 1 ml trong các ống vô trùng được đánh dấu “8-1433-1”, và được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh độc lực của thể phân lập này ở lợn.

Khoảng 4 giờ trước khi gây nhiễm, ống chứa thể phân lập trên thực địa của *Streptococcus suis* typ 2 có tính độc (thể phân lập 8-1433-1) được làm tan. Ống này được sử dụng để gây nhiễm môi trường mới và môi trường nuôi cấy này được ủ trên máy lắc tròn ở nhiệt độ 37°C cho đến khi đạt đến mật độ quang khoảng 1,0 ở bước sóng 600 nanomet (nm) trên máy đo quang phổ. Môi trường nuôi cấy này được nhuộm Gram; các khuẩn lạc đặc trưng của cầu khuẩn nhỏ dạng chuỗi và các tế bào đơn xuất hiện và rõ. Tổng số vi khuẩn sống dùng để gây nhiễm được xác định ngay trước khi và ngay sau khi gây nhiễm. Mỗi con lợn được nhận 2 ml dịch vi khuẩn gây nhiễm trong cơ.

Quan sát. Các con lợn được quan sát hằng ngày bởi những người không biết gì về sự phân bố điều trị. Các con lợn bất kỳ biểu hiện què chân, miễn

cường đứng lên, rối loạn hệ thần kinh trung ương (central nervous system - CNS), hoặc chết được ghi lại. “*S. suis* DMO” là chủng nhược độc bao gồm các SNP được nêu trong Bảng 1, được lưu giữ theo Hiệp ước Budapest với ký hiệu lưu giữ ở ATCC số PTA-13269.

Bảng 2. Vx dùng qua miệng/nghiên cứu gây nhiễm 1

Nhóm điều trị	Tỷ lệ phần trăm bị bệnh	Tỷ lệ phần trăm bị chết	Tỷ lệ phần trăm bảo vệ
6 log, DMO	50%	30%	70%
7 log, DMO	30%	10%	90%
8 log, DMO	44%	11%	89%
Đối chứng	90%	40%	60%

Bảng 3. Vx dùng qua miệng/nghiên cứu gây nhiễm 1

Nhóm điều trị	Tỷ lệ phần trăm bị bệnh	Tỷ lệ phần trăm bị chết	Tỷ lệ phần trăm bảo vệ
<i>S. suis</i> DMO	40%	30%	70%
Đối chứng	80%	40%	60%

Bảng 4. Vx dùng qua miệng/nghiên cứu gây nhiễm 2

Nhóm điều trị	Tỷ lệ phần trăm bị bệnh	Tỷ lệ phần trăm bị chết	Tỷ lệ phần trăm bảo vệ
6 log, DMO	15%	10%	90%
7 log, DMO	10,5%	5,2%	94,8%
8 log, DMO	10,5%	10,5%	89,5%
Đối chứng	60%	33,3%	66,7%

Bảng 5. Nghiên cứu hiệu lực 1

Nhóm	Số lượng bị chết	% bị chết	Số lượng bị bệnh	% bị bệnh
6 log, DMO	6/20	30%	9/20	45%
7 log, DMO	0/20	0%	4/20	20%
8 log, DMO	3/20	15%	6/20	30%

Đối chứng	6/20	30%	11/20	55%
-----------	------	-----	-------	-----

Bảng 6. Hiệu lực nghiên cứu 2

Nhóm	Số lượng bị chết	% bị chết	Số lượng bị bệnh	% bị bệnh
6 log, DMO	8/20	40%	12/20	60,0%
7 log, DMO	4/19	21,1%	11/19	58,0%
8 log, DMO	5/20	25,0%	5/20	25,0%
Đối chứng	10/19	52,6%	16/19	84,0%

Mặc dù các phương án được ưu tiên của sáng chế đã được mô tả chi tiết trên đây, cần hiểu rằng sáng chế được mô tả bởi các phương án này không bị giới hạn ở các chi tiết cụ thể được nêu trong phần mô tả trên do có thể có nhiều biến thể hiển nhiên của các phương án này mà không vượt quá nội dung hoặc phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Streptococcus suis* (*S. suis*) nhược độc có khả năng tạo ra đáp ứng miễn dịch an toàn và hiệu quả ở loài lợn kháng lại *S. suis* hoặc các bệnh do *S. suis* gây ra, trong đó chủng này có các thay thế axit amin ở các gen độc lực rpsL-S12 (protein tiểu đơn vị ribosom 30S), protein màng gắn kết ATP vận chuyển ABC (ABC-ATPBMP), trình tự điều hòa phiên mã marR so với chủng *S. suis* gốc có tính độc của nó, trong đó chủng gốc này bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa protein kiểu đại có trình tự peptit như được nêu trong SEQ ID NO: 2, 6 và 10, và trong đó chủng nhược độc này có trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin như được nêu trong SEQ ID NO: 4, 8 và 12.
2. Chủng vi khuẩn theo điểm 1, trong đó chủng vi khuẩn nhược độc này có trình tự axit nucleic như được nêu trong SEQ ID NO: 3, 7 và 11.
3. Chủng vi khuẩn theo điểm 1, trong đó (các) mức của (các) peptit được biểu hiện bởi rpsL-S12, ABC-ATPBMP, và marR, được giảm so với chủng *S. suis* gốc, trong đó chủng này biểu hiện các peptit rpsL-S12, ABC-ATPBMP, và marR có trình tự như được nêu trong SEQ ID NO: 2, 6, và 10.
4. Chủng vi khuẩn theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, chủng này được lưu giữ ở ATCC với ký hiệu lưu giữ số sáng chế PTA-13269.
5. Chế phẩm miễn dịch chứa chủng vi khuẩn nhược độc theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4.
6. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó chế phẩm này còn chứa chất dẫn thuốc, chất pha loãng hoặc tá dược, và chất bổ trợ được dụng hoặc dùng trong thú y được chọn từ chitosan, vi khuẩn đã được làm bất hoạt, virus đã được làm bất hoạt, các phần của vi khuẩn đã được làm bất hoạt, lipopolysaccarit của vi khuẩn, độc tố của vi khuẩn, hoặc các dẫn xuất hoặc tổ hợp của chúng.
7. Chế phẩm theo điểm 5, trong đó chế phẩm này tạo ra đáp ứng miễn dịch bảo vệ ở loài lợn kháng lại sự gây nhiễm *S. suis* có tính độc.
8. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 5 đến 7, trong đó chế phẩm này còn chứa ít nhất một kháng nguyên bổ sung liên quan đến mầm bệnh không phải là *S. suis*.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

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

<120> Chủng vi khuẩn Streptococcus suis nhược độc và chế phẩm miễn dịch chứa chủng vi khuẩn này

<130> MER 12-197

<150> USSN 61/664,935

<151> 2012-06-27

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 411

<212> ADN

<213> Streptococcus suis

<400> 1

atgcctacaa ttaaccagtt ggtacgtaaa ccacgtaagt cttaaagtaga aaaatctaaa 60

tcaccagctt tgaacgttgg ttacaacagc cgtaaaaaag ttcaaacaaa cgtttcatca 120

ccacaaaaac gcggtgttgc aactcgtgtc ggaacaatga cacctaaaaa acctaactca 180

gcccttcgta aatttgctcg tgtacgtttg agcaacctta tcgaagttac tgcttacatc 240

ccaggtatcg gtcacaactt gcaagaacac agtgtggttc ttcttcgtgg tggacgtgta 300

aaagaccttc caggggtacg ttaccatatc gttcgtggtg cacttgatac tgctggtgta 360

aacgatcgta agcaaggccg ttctaaatac ggtactaaac gtccaaaagg c 411

<210> 2

<211> 137

<212> PRT

<213> Streptococcus suis

<400> 2

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

Glu Lys Ser Lys Ser Pro Ala Leu Asn Val Gly Tyr Asn Ser Arg Lys

<212> PRT

<213> Streptococcus suis

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Tyr Gly Thr Lys Arg Pro Lys Gly
 130 135

<210> 5

<211> 1782

<212> ADN

<213> Streptococcus suis

<400> 5

atgaagacgt tacgtttttt ctggttttat tttaaacgct ataaactgtc ctttgctgtg 60

atTTTTctag ccattgtggc agcgacctac ctgcaggta agacacctgt tttccttgga 120

aatgccattg cggagatggg gaaaatcggg caggcttact ttatggccaa tcaagctggt 180

caggctgact ttcagccaga catggctgat tttaacggg ttatgctcaa tcttttcttt 240

gcctatgcgg cgacggttgt ggcttccttg atttactctc tctctttcac gcgtatcgtg 300
 gtcattcga ccaaccgtat gcgtaagggc ttgtttggca aactggaacg cttgacagtt 360
 gccttctttg atagccacaa ggacggggat atactttctc gctttaccag tgatttggac 420
 aatatccaaa acgctttcaa ccagtccttg acccaagtgg tgaccaacat cgctctttat 480
 gttggtatgg tcatcatgat gttccgtcag gatactcgct tggccttggg gaccattgct 540
 tctacgccag ttgccttgat tgccttggtc gttatcatcc gcctatcacg gaaatatacg 600
 gataagcaac aggctgcggt gtctaaactc aatgcctaca tggacgagaa aatttctgga 660
 caaaaagcga ttattgtaca aggtgtgcag gaagagacaa ttgatggttt cttggagctc 720
 aatgaagaag ttcgtcgcac aactttcaag ggacgcttgt ttggtgggat tctcttccca 780
 tttatgaatg gtatgagttt ggtcaatacg gccattgtta tctttgcagg ttccagcatt 840
 gttctcaatg acagctcact ggaaacagct gccgcacttg gtctggtggg gacttttgtt 900
 caatactcgc aacagtatta ccagccaatc atgcaggttg ctgccagctg ggcagaattg 960
 cagctagctt tcacaggagc tcatcgattt caggaaatgt ttgatgagcc tgaggaagtt 1020
 cgtoctcaaa acgctccgct atttaccgaa ttaaaagaag gtgttgaaat taaggacatc 1080
 gactttggct acttgccagg tcagaaggtc ttggacaagg tgtctatctc tgctcctaag 1140
 ggtaagatgg tggcggtcgt tggtcgcagc ggatctggta agactaccat tatgaacttg 1200
 attaaccgct tctacgatgt caatggtggg agtgtggcct ttgatggtcg cgatattcgg 1260
 gaatatgatt tggatagctt gcggaataag gtcggtatcg tcttgcagga gtcggtgtta 1320
 ttctcgggta ctattgcgga caatattcgc tttggtgatg agagcatttc gcaggaaatg 1380
 gtggaaaccg cagctcgtgc caccatatac cagacttca tcatgagctt gccagagggc 1440
 tatgaaacct ttgtgaccga tgatgagaat gtcttctcaa caggtcagaa acagttgatt 1500
 tccattgccc gtacgctttt gacagacca caagtcttga ttttggacga agcaacctca 1560
 aacgttgata ccgtaacgga ggccaaaatt caaaaggcta tggaggccat tatcgcagga 1620
 cggactagct togtcattgc ccaccgcctc aaaaccattc tcaatgcgga tgaaatcatc 1680
 gtctcaagg atggaaagg tctcgagcaa ggcaaccaca gccaaacttct caaactaaat 1740
 ggcttctacg ccgaacttta ccacaaccag tttgtgtttg aa 1782

<210> 6

<211> 594

<212> PRT

<213> Streptococcus suis

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Arg Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Asp Lys Gln Gln Ala Ala Val Ser
 195 200 205

Lys Leu Asn Ala Tyr Met Asp Glu Lys Ile Ser Gly Gln Lys Ala Ile
 210 215 220

Ile Val Gln Gly Val Gln Glu Glu Thr Ile Asp Gly Phe Leu Glu Leu
 225 230 235 240

Asn Glu Glu Val Arg Arg Thr Thr Phe Lys Gly Arg Leu Phe Gly Gly
 245 250 255

Ile Leu Phe Pro Phe Met Asn Gly Met Ser Leu Val Asn Thr Ala Ile
 260 265 270

Val Ile Phe Ala Gly Ser Ser Ile Val Leu Asn Asp Ser Ser Leu Glu
 275 280 285

Thr Ala Ala Ala Leu Gly Leu Val Val Thr Phe Val Gln Tyr Ser Gln
 290 295 300

Gln Tyr Tyr Gln Pro Ile Met Gln Val Ala Ala Ser Trp Ala Glu Leu
 305 310 315 320

Gln Leu Ala Phe Thr Gly Ala His Arg Ile Gln Glu Met Phe Asp Glu
 325 330 335

Pro Glu Glu Val Arg Pro Gln Asn Ala Pro Leu Phe Thr Glu Leu Lys
 340 345 350

Glu Gly Val Glu Ile Lys Asp Ile Asp Phe Gly Tyr Leu Pro Gly Gln
 355 360 365

Lys Val Leu Asp Lys Val Ser Ile Ser Ala Pro Lys Gly Lys Met Val
 370 375 380

Ala Val Val Gly Pro Thr Gly Ser Gly Lys Thr Thr Ile Met Asn Leu
 385 390 395 400

Ile Asn Arg Phe Tyr Asp Val Asn Gly Gly Ser Val Ala Phe Asp Gly
 405 410 415

Arg Asp Ile Arg Glu Tyr Asp Leu Asp Ser Leu Arg Asn Lys Val Gly
 420 425 430

Ile Val Leu Gln Glu Ser Val Leu Phe Ser Gly Thr Ile Ala Asp Asn
 435 440 445

Ile Arg Phe Gly Asp Glu Ser Ile Ser Gln Glu Met Val Glu Thr Ala
 450 455 460

Ala Arg Ala Thr His Ile His Asp Phe Ile Met Ser Leu Pro Glu Gly
 465 470 475 480

Tyr Glu Thr Phe Val Thr Asp Asp Glu Asn Val Phe Ser Thr Gly Gln
 485 490 495

Lys Gln Leu Ile Ser Ile Ala Arg Thr Leu Leu Thr Asp Pro Gln Val
 500 505 510

Leu Ile Leu Asp Glu Ala Thr Ser Asn Val Asp Thr Val Thr Glu Ala
 515 520 525

Lys Ile Gln Lys Ala Met Glu Ala Ile Ile Ala Gly Arg Thr Ser Phe
 530 535 540

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

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

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

Phe Glu

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

<400> 7

atgaagacgt tacgtttttt ctggttttat tttaaacgct ataaactgtc ctttgctgtg	60
atcttttctag ccattgtggc agcgacctac ctgcaggtta agacacctgt tttccttga	120
aatgccattg cggagatggg gaaaatcggg caggcttact ttatggccaa tcaagctggt	180
caggctgact ttcagccaga catggctgat tttaacgggg ttatgctcaa tcttttcttt	240
gcctatgcgg cgacggttgt ggcttccttg atttacctc tctcttcac gcgtatcgtg	300
gctcattcga ccaaccgtat gcataagggc ttgtttggca aactggaacg cttgacagtt	360
gccttctttg atagccacaa ggacggggat atactttctc gctttaccag tgatttggac	420
aatatccaaa acgctttcaa ccagtccttg acccaagtgg tgaccaacat cgctctttat	480
gttggtatgg tcatcatgat gttccgtcag gatactcgct tggccttggg gaccattgct	540
tctacgccag ttgccttgat tgcttggtc gttatcatcc gcctatcacg gaaatatacg	600
gataagcaac aggtgcgggt gtctaaactc aatgcctaca tggacgagaa aatttctgga	660
caaaaagcga ttattgtaca aggtgtgcag gaagagacaa ttgatggttt cttggagctc	720
aatgaagaag ttcgtgcac aactttcaag ggacgcttgt ttggtgggat tctcttccca	780
tttatgaatg gtatgagttt ggtcaatacg gccattgtta tctttgcagg ttccagcatt	840
gttctcaatg acagctcact ggaaacagct gccgcacttg gtctggtggt gacttttgtt	900
caatactcgc aacagtatta ccagccaatc atgcaggttg ctgccagctg ggcagaattg	960
cagctagctt tcacaggagc tcatcgtatt caggaaatgt ttgatgagcc tgaggaagtt	1020
cgctctcaaa acgctccgct atttaccgaa ttaaaagaag gtgttgaaat taaggacatc	1080
gactttggct acttgccagg tcagaaggtc ttggacaagg tgtctatctc tgctcctaag	1140
ggtaagatgg tggcggtcgt tggccgacg ggatctggta agactaccat tatgaacttg	1200
attaaccgct tctacgatgt caatggtggt agtgtggcct ttgatggctg cgatattcgg	1260
gaatatgatt tggatagctt gcggaataag gtcggtatcg tcttgcagga gtcggtgtta	1320
ttctcgggta ctattgcgga caatatcgc tttggtgatg agagcatttc gcaggaaatg	1380
gtggaaaccg cagctcgtgc caccatatac cagcacttca tcatgagctt gccagagggc	1440
tatgaaacct ttgtgaccga tgatgagaat gtcttctcaa caggtcagaa acagttgatt	1500
tccattgccc gtacgctttt gacagacca caagtcttga ttttggacga agcaacctca	1560

```

aacgttgata ccgtaacgga ggccaaaatt caaaaggcta tggaggccat tatcgcagga      1620
cggactagct tcgtcattgc ccaccgcctc aaaaccattc tcaatgcgga tgaaatcatc      1680
gtcctcaagg atggaaaggt tatcgagcaa ggcaaccaca gccaaacttct caaactaaat      1740
ggcttctacg ccgaacttta ccacaaccag tttgtgtttg aa                          1782

```

```

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

```

```

<400> 8

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

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

Ile Arg Leu Ser Arg Lys Tyr Thr Asp Lys Gln Gln Ala Ala Val Ser
 195 200 205

Lys Leu Asn Ala Tyr Met Asp Glu Lys Ile Ser Gly Gln Lys Ala Ile
 210 215 220

Ile Val Gln Gly Val Gln Glu Glu Thr Ile Asp Gly Phe Leu Glu Leu
 225 230 235 240

Asn Glu Glu Val Arg Arg Thr Thr Phe Lys Gly Arg Leu Phe Gly Gly
 245 250 255

Ile Leu Phe Pro Phe Met Asn Gly Met Ser Leu Val Asn Thr Ala Ile
 260 265 270

Val Ile Phe Ala Gly Ser Ser Ile Val Leu Asn Asp Ser Ser Leu Glu
 275 280 285

Thr Ala Ala Ala Leu Gly Leu Val Val Thr Phe Val Gln Tyr Ser Gln
 290 295 300

Gln Tyr Tyr Gln Pro Ile Met Gln Val Ala Ala Ser Trp Ala Glu Leu
 305 310 315 320

Gln Leu Ala Phe Thr Gly Ala His Arg Ile Gln Glu Met Phe Asp Glu
 325 330 335

Pro Glu Glu Val Arg Pro Gln Asn Ala Pro Leu Phe Thr Glu Leu Lys
 340 345 350

Glu Gly Val Glu Ile Lys Asp Ile Asp Phe Gly Tyr Leu Pro Gly Gln
 355 360 365

Lys Val Leu Asp Lys Val Ser Ile Ser Ala Pro Lys Gly Lys Met Val
 370 375 380

Ala Val Val Gly Pro Thr Gly Ser Gly Lys Thr Thr Ile Met Asn Leu
 385 390 395 400

Ile Asn Arg Phe Tyr Asp Val Asn Gly Gly Ser Val Ala Phe Asp Gly
 405 410 415

Arg Asp Ile Arg Glu Tyr Asp Leu Asp Ser Leu Arg Asn Lys Val Gly
 420 425 430

Ile Val Leu Gln Glu Ser Val Leu Phe Ser Gly Thr Ile Ala Asp Asn
 435 440 445

Ile Arg Phe Gly Asp Glu Ser Ile Ser Gln Glu Met Val Glu Thr Ala
 450 455 460

Ala Arg Ala Thr His Ile His Asp Phe Ile Met Ser Leu Pro Glu Gly
 465 470 475 480

Tyr Glu Thr Phe Val Thr Asp Asp Glu Asn Val Phe Ser Thr Gly Gln
 485 490 495

Lys Gln Leu Ile Ser Ile Ala Arg Thr Leu Leu Thr Asp Pro Gln Val
 500 505 510

Leu Ile Leu Asp Glu Ala Thr Ser Asn Val Asp Thr Val Thr Glu Ala
 515 520 525

Lys Ile Gln Lys Ala Met Glu Ala Ile Ile Ala Gly Arg Thr Ser Phe
 530 535 540

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

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

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

Phe Glu

<210> 9

<211> 447

<212> ADN

<213> Streptococcus suis

<400> 9

```

atgggacata ctattgcaga ttttcggaac ttgctcaatc agattgaaca aattagttaa      60
accattgcaa aagaatacga tgtggagcac ttggctggtc cacagggctg ggccttgctc      120
ttcattgcgg aacggtcgga agccgaaacc tttgtaaaag atatagaagc ggaattaaaag      180
atttccaaat cggttgccag caatctggtc aagagaaatg agaaaaatgg ctttatccaa      240
gtccttcctt ctaagggtga caaacgcttc aaacagctgg ttttgacaga gaagggacaa      300
gggaagatat gtcacctgaa agcttttcat gaagaaatgc accattcact tttttggggc      360
attcaaaaag aggactttga cttgggttaa caggtgggca atcaattaaa agtaaattatt      420
caacgctata aggagaagaa tcatgtt                                     447

```

<210> 10

<211> 149

<212> PRT

<213> Streptococcus suis

<400> 10

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Val Ala Ser Asn Leu Val Lys Arg Met Glu Lys Asn Gly Phe Ile Gln
65           70           75           80

```

Val Leu Pro Ser Lys Val Asp Lys Arg Phe Lys Gln Leu Val Leu Thr
 85 90 95

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

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

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

Glu Lys Asn His Val
 145

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

<400> 11
 atgggacata ctattgcaga ttttcggaac ttgctcaatc agattgaaca aattagttaa 60
 accattgcaa aagaatacga tgtggagcac ttggctgggc cacagggctg ggccttgccg 120
 ttcatcgcg aacggctcga agccgaaacc tttgtaaaag atatagaagc ggaattaaag 180
 atttccaaat cggttgccag caatctgggc aagagaatgg agaaaaatgg ctttatccaa 240
 gtccttcct ctaagggtga caaatgcttc aaacagctgg ttttgacaga gaagggacaa 300
 gggaagatat gtcacctgaa agcttttcat gaagaaatgc accattcact tttttggggc 360
 attcaaaaag aggactttga cttgggttaa cagggtgggc atcaattaaa agtaaatatt 420
 caacgctata aggagaagaa tcatgtt 447

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

<400> 12

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

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

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

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

Val Ala Ser Asn Leu Val Lys Arg Met Glu Lys Asn Gly Phe Ile Gln
 65 70 75 80

Val Leu Pro Ser Lys Val Asp Lys Cys Phe Lys Gln Leu Val Leu Thr
 85 90 95

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

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

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

Glu Lys Asn His Val
 145