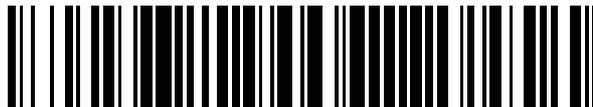


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 967**

51 Int. Cl.:
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03701402 .4**
96 Fecha de presentación: **11.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1472353**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.11.2004**

54 Título: **Antígeno de streptococcus del grupo B**

30 Prioridad:
11.02.2002 US 354947 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2012

73 Titular/es:
**ID BIOMEDICAL CORPORATION
525 CARTIER BOULEVARD WEST
LAVAL, QC H7V 3S8, CA**

72 Inventor/es:
**RIOUX, Stéphane;
MARTIN, Denis;
HAMEL, Josée y
BRODEUR, Bernard, R.**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 381 967 T3

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

DESCRIPCIÓN

Antígeno de *Streptococcus* del grupo B

Campo de la invención

5 La presente invención está relacionada con polipéptidos, epítopes y anticuerpos dirigidos a estos epítopes, más particularmente al polipéptido de Sip de *Streptococcus* del grupo B (GBS), también llamado *Streptococcus agalactiae*, que pueden usarse para prevenir, diagnosticar y/o tratar infección estreptocócica.

Antecedentes de la invención

10 Los *Streptococcus* son bacterias Gram (+) que se diferencian por antígenos de hidratos de carbono específicos para grupos A a O encontrados sobre su superficie celular. Los grupos de *Streptococcus* se distinguen adicionalmente por antígenos de polisacáridos capsulares específicos para tipo. Se han identificado varios serotipos para el *Streptococcus* del grupo B (GBS): Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII. Los GBS también contienen proteínas antigénicas conocidas como "proteínas C" (alfa, beta, gamma y delta), algunas de las cuales se han clonado.

15 Aunque GBS es un componente común de la flora vaginal y colónica humana normal, este patógeno se reconoce desde hace tiempo como una causa principal de septicemia neonatal y meningitis, meningitis de aparición tardía en lactantes, endometritis postparto, además de mastitis en rebaños de ganado lechero. Futuras madres expuestas a GBS están en riesgo de infección postparto y pueden transferir la infección a su bebé cuando el niño pasa por la vía del parto. Aunque el organismo es sensible a antibióticos, la alta tasa de ataque y la rápida aparición de septicemia en neonatos y meningitis en lactantes produce alta morbilidad y mortalidad.

20 Las infecciones por GBS en lactantes están limitadas a una infancia muy temprana. Aproximadamente el 80 % de las infecciones en lactantes se producen en los primeros días de vida, la llamada enfermedad de aparición temprana. Las infecciones de aparición tardía se producen en lactantes entre 1 semana y 2 a 3 meses de edad. Los síndromes clínicos de enfermedad por GBS en recién nacidos incluyen septicemia, meningitis, neumonía, celulitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, epiglotis. Además de enfermedad aguda debida a GBS, que es por sí misma costosa, las infecciones por GBS en recién nacidos pueden producir muerte, discapacidad y, en casos raros, la reaparición de infección. Aunque el organismo es sensible a antibióticos, la alta tasa de ataque y la rápida aparición de septicemia en neonatos y meningitis en lactantes produce alta morbilidad y mortalidad.

25 Entre mujeres embarazadas, GBS produce enfermedad clínica que varía de infección urinaria leve a septicemia y meningitis potencialmente mortales, que también incluyen osteomielitis, endocarditis, amnionitis, endometritis, infecciones por heridas (postcesárea y postepisiotomía), celulitis, fascitis.

30 Entre personas adultas no embarazadas, las presentaciones clínicas de enfermedad por GBS invasiva casi siempre toman la forma de bacteremia primaria, pero también piel de infección de tejido blando, neumonía, urosepticemia, endocarditis, peritonitis, meningitis, empiema. La piel de infecciones de tejido blando incluye celulitis, úlceras periféricas infectadas, osteomielitis, artritis séptica e infecciones por decúbito o por heridas. Entre personas en riesgo, hay huéspedes debilitados tales como personas con una enfermedad crónica tal como diabetes mellitus y

35 cáncer, o personas ancianas. Las infecciones por GBS también pueden producirse en animales y producen mastitis en rebaños de ganado lechero.

40 Para encontrar una vacuna que protegerá a los individuos de infección por GBS, los investigadores han vuelto a los antígenos específicos para tipo. Desafortunadamente, estos polisacáridos han demostrado ser escasamente inmunogénicos en seres humanos y están limitados al serotipo particular del que se origina el polisacárido. Además, los antígenos de polisacáridos capsulares son inadecuados como componente de vacuna para la protección contra infección por GBS.

45 Otros se han centrado en el antígeno beta de la proteína C que demostró propiedades inmunogénicas en ratones y modelos de conejo. Se encontró que esta proteína era inadecuada como vacuna humana debido a su propiedad no deseable de interaccionar con alta afinidad y en un modo no inmunogénico con la región Fc de IgA humana. Los antígenos alfa de la proteína C son raros en serotipos de tipo III de GBS, que es el serotipo responsable de la mayoría de las afecciones mediadas por GBS y, por tanto, son de poco uso como componente de vacuna.

50 El documento PCT WO 99/42588 se publicó el 17 de febrero de 1999, titulado 'Antígenos de *Streptococcus* del grupo B', que describe el polipéptido ID-42, que se reivindica que es antigénico. Este polipéptido se conoce ahora con el nombre Sip, de Surface Immunogenic Protein (proteína inmunogénica superficial) (Brodeur y col., 2000, Infect. Immun. 68:5610).

Se encontró que este polipéptido estaba altamente conservado y se produjo por cada GBS examinado hasta la fecha, que incluyó cepas aisladas representativas de todos los serotipos (Brodeur y col., 2000, Infect. Immun. 68:5610). Este polipéptido de 53 kDa es reconocido por el sistema inmunitario humano. Y, lo que es más importante,

5 se mostró que la inmunización de ratones adultos con el polipéptido de Sip inducía una fuerte respuesta específica de anticuerpo y confería protección contra infección experimental con cepas de GBS que representaban los serotipos Ia/c, Ib, II/R, III, V y VI (Brodeur y col.). También se demostró que los anticuerpos específicos para Sip reconocieron sus epítopes en las superficies celulares de diferentes cepas de GBS, que incluyen representantes de los nueve serotipos (Rioux y col., 2001, Infect. Immun. 69:5162). Además, recientemente se informó que la administración pasiva de anti-suero de Sip de conejo a ratones preñados o la inmunización de ratones hembra antes del embarazo con Sip recombinante purificada confirió inmunidad protectora a sus crías contra infección por GBS (Martin y col. Abstr. 101th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 2001).

10 Por tanto, queda una necesidad sin satisfacer de polipéptidos de *Streptococcus* del grupo B que puedan usarse para prevenir, diagnosticar y/o tratar infección por *Streptococcus* del grupo B. Se presentan datos que describen la localización de regiones accesibles a la superficie sobre el polipéptido de Sip de *Streptococcus* del grupo B. También se presentan ejemplos que presentan la utilización de estas regiones accesibles a la superficie para el desarrollo de vacunas.

Resumen de la invención

15 Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 85 % a la largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12, en el que el polipéptido codificado conserva la capacidad de producir anticuerpos que tienen especificidad de unión por *Streptococcus* del grupo B. En el presente documento también se desvela un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 70 % de
20 identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 1 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos del mismo.

En otros aspectos se proporcionan polipéptidos codificados por polinucleótidos de la invención en la medida en que estén englobados por las reivindicaciones adjuntas, vectores que comprenden polinucleótidos de la invención operativamente ligados a una región de control de la expresión, además de células huésped transfectadas con dichos vectores y procedimientos para producir polipéptidos que comprenden cultivar dichas células huésped en condiciones adecuadas para la expresión.
25

En otro aspecto la presente invención proporciona un procedimiento para la detección de un anticuerpo específico para antígeno de *Streptococcus* del grupo B en una muestra biológica previamente obtenida de un huésped, que comprende:

- 30 (a) incubar uno o más de los polipéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16 con la muestra biológica para formar una mezcla; y
(b) detectar polipéptido específicamente unido en la mezcla que indica la presencia de un anticuerpo específico para el antígeno de *Streptococcus* del grupo B en la muestra.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 para la detección o el diagnóstico de infección por *Streptococcus* del grupo B.
35

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la secuencia de ADN del gen Δsip-1 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo Ia/c; (SEC ID N°: 1).

40 La Figura 2 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ΔSip-1 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo Ia/c; (SEC ID N°: 2).

La Figura 3 representa la secuencia de ADN del gen Δsip-2 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo Ia/c; (SEC ID N°: 3).

La Figura 4 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ΔSip-2 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo Ia/c; (SEC ID N°: 4).

45 La Figura 5 representa la secuencia de ADN del gen Δsip-3 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo Ia/c; (SEC ID N°: 5).

La Figura 6 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ΔSip-3 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo Ia/c; (SEC ID N°: 6).

50 La Figura 7 representa la secuencia de ADN del gen Δsip-4 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo Ia/c; (SEC ID N°: 7).

La Figura 8 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ΔSip-4 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo Ia/c; (SEC ID N°: 8).

La Figura 9 representa la secuencia de ADN del gen Δsip-5 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo la/c; (SEC ID N°: 9).

La Figura 10 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ΔSip-5 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo la/c; (SEC ID N°: 10).

5 La Figura 11 representa la secuencia de ADN del gen Δsip-6 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo la/c; (SEC ID N°: 11).

La Figura 12 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ΔSip-6 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo la/c; (SEC ID N°: 12).

10 La Figura 13 representa la secuencia de ADN del gen Δsip-7 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo la/c; (SEC ID N°: 13).

La Figura 14 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ΔSip-7 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo la/c; (SEC ID N°: 14).

La Figura 15 representa la secuencia de ADN del gen Δsip-8 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo la/c; (SEC ID N°: 15).

15 La Figura 16 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de Δip-8 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo la/c; (SEC ID N°: 16).

La Figura 17 representa la secuencia de ADN del gen Δsip-9 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo la/c; (SEC ID N°: 17).

20 La Figura 18 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ΔSip-9 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo la/c; (SEC ID N°: 18).

La Figura 19 representa la secuencia de ADN del gen Δsip-10 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo la/c; (SEC ID N°: 19).

La Figura 20 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de ΔSip-10 de la cepa C388/90 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo la/c; (SEC ID N°: 20).

25 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona polinucleótidos purificados y aislados que codifican polipéptidos de *Streptococcus* que pueden usarse para prevenir, diagnosticar y/o tratar infección por *Streptococcus*. Los polinucleótidos son como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

30 En el presente documento también se desvelan: un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 70 % de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos del mismo;

un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 80 % de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos del mismo;

35 un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 95 % de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos del mismo;

un polinucleótido que codifica un epítipo que lleva una porción de un polipéptido que comprende una secuencia elegida de: SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20 o fragmentos o análogos del mismo;

40 un epítipo que lleva porciones de un polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20 o fragmentos o análogos del mismo;

un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 70 % de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20;

45 un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 80 % de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20;

un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 95 % de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20;

un polinucleótido que codifica un epítipo que lleva una porción de un polipéptido que comprende una secuencia

elegida de: SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20;

un epítoto que lleva porciones de un polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20.

5 La presente invención proporciona un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 85 % a la largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12, en el que el polipéptido conserva la capacidad de producir anticuerpos que tienen especificidad de unión por *Streptococcus* del grupo B. La invención proporciona además el polipéptido de la reivindicación 11 que consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 90 % a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12. La invención proporciona además el polipéptido de la reivindicación 11 que consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 95 % a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12. La invención proporciona además el polipéptido aislado de la reivindicación 11 que consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 99 % a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12. La invención proporciona además el polipéptido aislado de la reivindicación 11 que consiste en la secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12.

La presente divulgación proporciona un polipéptido aislado que comprende un polipéptido elegido de:

- (a) un polipéptido que tiene al menos el 70 % de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de: SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos del mismo;
- (b) un polipéptido que tiene al menos el 95 % de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de: SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos del mismo;
- (c) un polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos del mismo;
- (d) un polipéptido que puede generar anticuerpos que tienen especificidad de unión por un polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos del mismo;
- (e) un epítoto que lleva una porción de un polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos del mismo;
- (f) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que el residuo Met del extremo N está delecionado;
- (g) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que la secuencia de aminoácidos secretora está delecionada.

La presente divulgación proporciona un polipéptido aislado que comprende un polipéptido elegido de:

- (a) un polipéptido que tiene al menos el 70 % de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20;
- (b) un polipéptido que tiene al menos el 95 % de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20;
- (c) un polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20;
- (d) un polipéptido que puede generar anticuerpos que tienen especificidad de unión por un polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20;
- (e) un epítoto que lleva una porción de un polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20;
- (f) el polipéptido de (a), (b), (c), (d) o (e) en el que el residuo Met del extremo N está delecionado;
- (g) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que la secuencia de aminoácidos secretora está delecionada.

45 Según un aspecto, la presente divulgación se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos del mismo.

Según un aspecto, la presente divulgación se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20.

50 Aquellos expertos en la materia apreciarán que la invención incluye moléculas de ADN, es decir, polinucleótidos y sus secuencias complementarias que codifican análogos tales como mutantes, variantes, homólogos y derivados de tales polipéptidos, como se describen en el presente documento en la presente solicitud de patente. La invención también incluye moléculas de ARN correspondientes a las moléculas de ADN de la invención. Además de las moléculas de ADN y ARN, la divulgación incluye los polipéptidos y anticuerpos monoespecíficos correspondientes que se unen específicamente a tales polipéptidos.

En otra realización, los polipéptidos según la presente invención son antigénicos.

55 En otra realización, los polipéptidos según la presente invención son inmunogénicos.

En otra realización, los polipéptidos según la presente invención pueden provocar una respuesta inmunitaria en un

huésped.

En otra realización, la presente invención también se refiere a polipéptidos que pueden producir anticuerpos que tienen especificidad de unión por los polipéptidos de la presente invención como se ha definido anteriormente.

5 Un anticuerpo que “tiene especificidad de unión” es un anticuerpo que reconoce y se une al polipéptido seleccionado, pero que no reconoce sustancialmente y se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica. La unión específica puede medirse usando un ensayo de ELISA en el que el polipéptido seleccionado se usa como antígeno.

10 Según la presente invención, “protección” en los estudios biológicos se define por un aumento significativo en la curva, tasa o periodo de supervivencia. El análisis estadístico usando la prueba del orden logarítmico para comparar curvas de supervivencia y la prueba exacta de Fisher para comparar las tasas de supervivencia y números de días hasta la muerte, respectivamente, podrían ser útiles para calcular valores de p y determinar si la diferencia entre los dos grupos es estadísticamente significativa. Los valores de p de 0,05 se consideran como no significativos.

En un aspecto adicional de la divulgación se proporcionan fragmentos antigénicos/inmunogénicos de los polipéptidos de la invención, o de análogos de los mismos.

15 Los fragmentos de la presente divulgación deben incluir una o más de tales regiones epitópicas o ser suficientemente similares a tales regiones para retener sus propiedades antigénicas/inmunogénicas. Por tanto, para los fragmentos según la presente divulgación, el grado de identidad es quizás irrelevante, ya que pueden ser el 100 % idénticos a una parte particular de un polipéptido o análogo del mismo como se describe en el presente documento. La presente divulgación proporciona además fragmentos que tienen al menos 10 residuos de
20 aminoácidos contiguos de las secuencias de polipéptidos de la presente invención. En una realización, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos. En una realización, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos.

25 Los términos “fragmento” o “variante,” cuando se refieren a un polipéptido de la invención, significan un polipéptido que conserva sustancialmente al menos una de las funciones o actividades biológicas del polipéptido. Una función o actividad biológica tal puede ser, por ejemplo, cualquiera de aquellas descritas anteriormente, e incluye tener la capacidad para reaccionar con un anticuerpo, es decir, que tiene un péptido que lleva un epítipo. Los fragmentos o variantes de los polipéptidos, por ejemplo, de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20 tienen suficiente similitud con aquellos polipéptidos de manera que se conserva al menos una actividad de los polipéptidos nativos. Los fragmentos o variantes de polipéptidos más pequeños, por ejemplo, de los polipéptidos de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10,
30 12, 14, 16, 18 ó 20 conservan al menos una actividad (por ejemplo, una actividad expresada por un dominio funcional de los mismos, o la capacidad para reaccionar con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención) de una secuencia comparable encontrada en el polipéptido nativo.

La materia clave, de nuevo, es que el fragmento conserva las propiedades antigénicas/inmunogénicas.

35 El experto apreciará que análogos de los polipéptidos de la invención también se usarán en el contexto de la presente invención, es decir, como material antigénico/inmunogénico. Por tanto, por ejemplo, proteínas o polipéptidos que incluyen una o más adiciones, deleciones, sustituciones o similares están englobados por la presente invención, en tanto que estén englobados por las reivindicaciones adjuntas.

40 Como se usa en el presente documento, “fragmentos”, “análogos”, “variantes” o “derivados” de los polipéptidos de la invención incluyen aquellos polipéptidos en los que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente conservado) y que puede ser natural o no natural y que están englobados por las reivindicaciones adjuntas. En un caso de la divulgación, los derivados y análogos de polipéptidos de la invención tendrán aproximadamente el 70 % de identidad con aquellas secuencias ilustradas en las figuras o fragmentos de los mismos. Es decir, el 70 % de los residuos son los mismos. En otro caso, los polipéptidos tendrán más del 80 % de identidad. En otra realización, los polipéptidos tendrán más del 85 % de identidad. En otra realización, los polipéptidos tendrán más del 90 % de identidad. En otra realización, los polipéptidos tendrán más del 95 % de identidad. En otra realización, los polipéptidos tendrán más del 99 % de identidad. En otra realización, los análogos de polipéptidos de la invención tendrán menos de aproximadamente 20 sustituciones, modificaciones o deleciones de residuos de aminoácidos, y más preferentemente menos de 10.

50 Una variante de un polipéptido de la invención puede ser, por ejemplo, (i) una en la que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y tal residuo de aminoácido sustituido puede o puede no ser uno codificado por el código genético, o (ii) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, o (iii) uno en el que el polipéptido está fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el que aminoácidos adicionales están fusionados con el polipéptido, tal como una secuencia conductora o secretora o una secuencia que se emplea para la
55 purificación del polipéptido, comúnmente con el fin de crear una forma genéticamente manipulada de la proteína que sea susceptible a la secreción de una célula, tal como una célula transformada. Los aminoácidos adicionales pueden ser de una fuente heteróloga, o pueden ser endógenos al gen natural.

Estas sustituciones son aquellas que tienen una influencia mínima sobre la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido. Sustituciones preferidas son aquellas conocidas en la técnica como conservadas, es decir, los residuos sustituidos comparten propiedades físicas o químicas tales como hidrofobia, tamaño, carga o grupos funcionales. Éstas incluyen sustituciones tales como aquellas descritas por Dayhoff, M. en *Atlas of Protein Sequence and Structure* 5, 1978 y por Argos, P. en *EMBO J.* 8, 779-785, 1989. Por ejemplo, los aminoácidos, tanto naturales como no naturales, que pertenecen a uno de los siguientes grupos, representan cambios conservativos:

ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr, val;
 cys, ser, tyr, thr;
 val, ile, leu, met, ala, phe;
 lys, arg, orn, his;
 y phe, tyr, trp, his.

Las sustituciones preferidas también incluyen sustituciones de D-enantiómeros para los L-aminoácidos correspondientes.

Polipéptidos variantes que pertenecen al tipo (i) anterior incluyen, por ejemplo, muteínas, análogos y derivados. Un polipéptido variante puede diferenciarse en la secuencia de aminoácidos por, por ejemplo, una o más adiciones, sustituciones, deleciones, inserciones, inversiones, fusiones y truncaciones, o una combinación de cualquiera de éstas. Los polipéptidos variantes que pertenecen al tipo (ii) anterior incluyen, por ejemplo, polipéptidos modificados. Modificaciones de polipéptidos conocidas incluyen, pero no se limitan a, glucosilación, acetilación, acilación, ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclización, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubicuitinación.

Tales modificaciones son muy conocidas para aquellos expertos en la materia y se han descrito en gran detalle en la bibliografía científica. Varias modificaciones particularmente comunes, glucosilación, unión a lípido, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ribosilación de ADP, por ejemplo, se describen en muchos textos básicos tales como *Proteins – Structure and Molecular Properties*, 2ª ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1993). Muchas revisiones detalladas están disponibles en este objeto, tal como por Wold, F., *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York 1-12 (1983); Seifter y col. (1990) *Meth. Enzymol.* 182:626-646 y Rattan y col. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:48-62.

Polipéptidos variantes que pertenecen al tipo (iii) son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, PEGilación u otras modificaciones químicas. Polipéptidos variantes que pertenecen al tipo (iv) anterior incluyen, por ejemplo, preproteínas o proproteínas que pueden activarse por escisión de la porción de proproteína para producir un polipéptido maduro activo. Las variantes incluyen una variedad de polipéptidos híbridos, quiméricos o de fusión. Ejemplo típicos de tales variantes se tratan en cualquier parte en el presente documento.

Muchos otros tipos de variantes son conocidas para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, como es muy conocido, los polipéptidos no son siempre completamente lineales. Por ejemplo, los polipéptidos pueden estar ramificados como resultado de ubicuitinación, y pueden ser circulares, con o sin ramificaciones, generalmente como resultado de acontecimientos de postraducción que incluyen acontecimientos de procesamiento naturales y acontecimientos provocados por manipulación humana que no se producen naturalmente. Los polipéptidos circulares, ramificados y circulares ramificados pueden sintetizarse por procedimientos naturales de no traducción y por procedimientos sintéticos.

Pueden producirse modificaciones o variaciones en cualquier parte en un polipéptido, que incluyen el esqueleto de péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. El mismo tipo de modificación puede estar presente al mismo grado o a un grado variable en varios sitios en un polipéptido dado. Por tanto, un polipéptido dado puede contener más de un tipo de modificación. El bloque del grupo amino o carboxilo en un polipéptido, o ambos, por una modificación covalente es común en polipéptidos que se producen naturalmente y sintéticos. Por ejemplo, el residuo del extremo amino de polipéptidos preparados en *E. coli*, antes del procesamiento proteolítico, es frecuentemente N-formilmethionina. Las modificaciones pueden ser una función de cómo está hecha la proteína. Para polipéptidos recombinantes, por ejemplo, las modificaciones se determinan por la capacidad de modificación postraduccionales de células huésped y las señales de modificación en la secuencia de aminoácidos de polipéptido. Por consiguiente, si se desea la glucosilación, un polipéptido puede expresarse en un huésped glicosilante, generalmente una célula eucariota. Las células de insecto frecuentemente llevan las mismas glicosilaciones postraduccionales que las células de mamífero y, por este motivo, los sistemas de expresión de células de insecto se han desarrollado para expresar eficientemente proteínas de mamífero que tienen patrones nativos de glucosilación. Consideraciones similares se aplican a otras modificaciones.

- Los polipéptidos variantes pueden ser completamente funcionales o pueden carecer de función en una o más actividades, por ejemplo, en cualquiera de las funciones o actividades descritas anteriormente. Entre los muchos tipos de variaciones útiles están, por ejemplo, aquellas que presentan alteración de la actividad catalítica. Por ejemplo, una realización implica una variación en el sitio de unión que produce la unión, pero no la hidrólisis, o hidrólisis más lenta, de cAMP. Otra variación útil en el mismo sitio puede producir afinidad alterada por cAMP. Variaciones útiles también incluyen cambios que proporcionan afinidad por otro nucleótido cíclico. Otra variación útil incluye una que previene la activación por proteína cinasa A. Otra variación útil proporciona una proteína de fusión en la que uno o más dominios o subregiones están funcionalmente fusionados a uno o más dominios o subregiones de otra isoforma o familia de fosfodiesterasa.
- 5
- En un enfoque alternativo, los análogos podrían ser polipéptidos de fusión que incorporaran restos que hicieran que la purificación fuera más fácil, por ejemplo, marcando eficazmente el polipéptido deseado. Puede ser necesario eliminar la "marca" o puede ser el caso que el propio polipéptido de fusión retenga suficiente antigenicidad para ser útil.
- 10
- La presente invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende el polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 11-15.
- 15
- El porcentaje de homología se define como la suma del porcentaje de identidad más el porcentaje de similitud o conservación del tipo de aminoácido.
- En un caso, los análogos de polipéptidos de la divulgación tendrán aproximadamente el 70 % de homología con aquellas secuencias ilustradas en las figuras o fragmentos de los mismos. En un caso, los polipéptidos tendrán más del 80 % de homología. En otra realización, los polipéptidos tendrán más del 85 % de homología. En otra realización, los polipéptidos tendrán más del 90 % de homología. En otra realización, los polipéptidos tendrán más del 95 % de homología. En otra realización, los polipéptidos tendrán más del 99 % de homología. En otra realización, los análogos de polipéptidos de la invención tendrán menos de aproximadamente 20 sustituciones, modificaciones o deleciones de residuos de aminoácidos y más preferentemente menos de 10.
- 20
- Puede usarse un programa tal como el programa CLUSTAL para comparar secuencias de aminoácidos. Este programa compara secuencias de aminoácidos y encuentra el alineamiento óptimo insertando espacios en cualquier secuencia según convenga. Es posible calcular la identidad de aminoácidos u homología para un alineamiento óptimo. Un programa como BLASTx alineará la extensión más larga de secuencias similares y asignará un valor para el ajuste. Por tanto, es posible obtener una comparación en la que se encuentran varias regiones de similitud, teniendo cada una una puntuación diferente. Ambos tipos de análisis de identidad se contemplan en la presente invención.
- 25
- En un enfoque alternativo, los análogos o derivados podrían ser polipéptidos de fusión que incorporan restos que hacen que la purificación sea más fácil, por ejemplo, marcando eficazmente la proteína o polipéptido deseado; puede ser necesario eliminar la "marca" o puede ser el caso de que el propio polipéptido de fusión retenga suficiente antigenicidad para ser útil.
- 30
- En un aspecto adicional de la divulgación se proporcionan fragmentos antigénicos/inmunogénicos de las proteínas o polipéptidos o de análogos o derivados de los mismos.
- 35
- Por tanto, lo que es importante para análogos, derivados y fragmentos es que posean al menos un grado de antigenicidad/inmunogénico de la proteína o polipéptido de los que se derivan.
- 40
- También están incluidos polipéptidos que se han fusionado a otros compuestos que alteran las propiedades biológicas o farmacológicas de polipéptidos, es decir, polietilenglicol (PEG) para aumentar la semivida; secuencias de aminoácidos conductoras o secretoras para facilitar la purificación; prepro- y pro- secuencias; y (poli)sacáridos.
- Además, en aquellas situaciones en las que se encuentra que las regiones de aminoácido son polimórficas puede desearse variar uno o más aminoácidos particulares para imitar más eficazmente los diferentes epítopes de las diferentes cepas de *Streptococcus*.
- 45
- Además, los polipéptidos de la presente invención pueden modificarse por acilación de -NH₂ terminal (por ejemplo, por acetilación, o amidación de ácido tioglicólico, amidación del carboxi terminal, por ejemplo, con amoniaco o metilamina) para proporcionar estabilidad, aumento de la hidrofobia para el enlace o unión a un soporte u otra molécula.
- 50
- También se contemplan multímeros de hetero y homopolipéptidos de los fragmentos de polipéptidos y análogos. Estas formas poliméricas incluyen, por ejemplo, uno o más polipéptidos que se han reticulado con reticuladores tales como avidina/biotina, glutaraldehído o dimetilsuperimidato. Tales formas poliméricas también incluyen polipéptidos que contienen dos o más secuencias contiguas en tándem o invertidas producidas a partir de ARNm multicistronicos generados por tecnología de ADN recombinante. En otra realización, la presente invención también se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden uno o más polipéptidos o fragmentos o análogos de los mismos como se define en las figuras de la presente solicitud.
- 55

La presente invención proporciona un polipéptido quimérico que comprende dos o más polipéptidos en el que cada uno de los dos o más polipéptidos consiste en una secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°:4, 6, 8 y 12, siempre que los dos o más polipéptidos estén unidos de manera que formen un polipéptido quimérico.

5 En otra realización, la presente divulgación también se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden dos o más polipéptidos que tienen una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos de los mismos; siempre que los polipéptidos estén unidos de manera que formen un polipéptido quimérico.

En otra realización, la presente divulgación también se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden dos o más polipéptidos que tienen una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20, siempre que los polipéptidos estén unidos de manera que formen un polipéptido quimérico.

10 Preferentemente, un fragmento, análogo o derivado de un polipéptido de la invención comprenderá al menos una región antigénica, es decir, al menos un epítope.

15 Con el fin de lograr la formación de polímeros antigénicos (es decir, multímeros sintéticos), pueden utilizarse polipéptidos que tienen grupos bishaloacetilo, haluros de nitroarilo o similares, en los que los reactivos son específicos para grupos tio. Por tanto, el enlace entre dos grupos mercapto de los diferentes polipéptidos puede ser un enlace sencillo o puede estar compuesto por un grupo de enlace de al menos dos, normalmente al menos cuatro, y no más de 16, pero normalmente no más de aproximadamente 14, átomos de carbono.

20 En un caso particular, fragmentos de polipéptidos y análogos no contienen un residuo de partida de metionina (Met). Preferentemente, los polipéptidos no incorporarán una secuencia conductora o secretora (secuencia señal). La porción señal de un polipéptido de la invención puede determinarse según técnicas biológicas moleculares establecidas. En general, el polipéptido de interés puede aislarse de un cultivo de *Streptococcus* y posteriormente secuenciarse para determinar el residuo inicial de la proteína madura y, por tanto, la secuencia del polipéptido maduro.

En otro caso, los polipéptidos de la divulgación pueden carecer de un péptido conductor del extremo N y/o un dominio transmembrana y/o un dominio de anclaje del extremo C.

25 La presente divulgación proporciona además un fragmento del polipéptido que comprende sustancialmente todo el dominio celular adicional de un polipéptido que tiene al menos el 70 % de identidad, preferentemente el 80 % de identidad, más preferentemente el 95 % de identidad, con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20 o fragmentos o análogos del mismo, a lo largo de toda la longitud de dichas secuencias.

30 Se entiende que los polipéptidos pueden producirse y/o usarse sin su codón de iniciación (metionina o valina) y/o sin su péptido conductor para favorecer la producción y purificación de polipéptidos recombinantes. Se sabe que la clonación de genes sin secuencias que codifican péptidos conductores limitará los polipéptidos al citoplasma de *E. coli* y facilitará su recuperación (Glick, B.R. y Pastarnak, J.J. (1998) Manipulation of gene expression in prokaryotes. En "Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA", 2ª edición, ASM Press, Washington DC, pág. 109-143).

35 La presente invención proporciona una vacuna que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 y un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona además una vacuna que comprende el polipéptido de fusión según la reivindicación 16 o el polipéptido quimérico de la reivindicación 17 y un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

40 Según otro aspecto de la divulgación, también se proporciona (i) una composición de materia que contiene un polipéptido, junto con un vehículo, diluyente o adyuvante; (ii) una composición farmacéutica que comprende un polipéptido y un vehículo, diluyente o adyuvante; (iii) una vacuna que comprende un polipéptido y un vehículo, diluyente o adyuvante; (iv) un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra *Streptococcus* en un huésped administrando al huésped una cantidad inmunogénicamente eficaz de un polipéptido para provocar una
45 respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta inmunitaria protectora a *Streptococcus*; y particularmente, (v) un procedimiento para prevenir y/o tratar una infección por *Streptococcus*, administrando una cantidad profiláctica o terapéutica de un polipéptido a un huésped en necesidad.

50 Antes de la inmunización, los polipéptidos de la invención también pueden acoplarse o conjugarse a proteínas transportadoras tales como toxina tetánica, toxina diftérica, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, antígeno del virus de la poliomiélitis VP1 o cualquier otra toxina o antígeno vírico o bacteriano o cualquier proteína adecuada para estimular el desarrollo de una respuesta inmunitaria más fuerte. Este acoplamiento o conjugación puede hacerse químicamente o genéticamente. Una descripción más detallada de la conjugación péptido-vehículo está disponible en Van Regenmortel, M.H.V., Briand J.P., Muller S., Plaué S., «Synthetic Polypeptides as antigens» en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 19 (ed.) Burdou, R. H. & Van Knippenberg P.H. (1988), Elsevier New York.

55 Según otro aspecto de la divulgación se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más

polipéptidos de *Streptococcus* de la invención en una mezcla con un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Adyuvantes adecuados incluyen (1) formulaciones de emulsión de aceite en agua tales como MF59™, SAF™, Ribi™; (2) adyuvante completo o incompleto de Freund; (3) sales, es decir, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$, $\text{Al}(\text{OH})_3$, AlPO_4 , sílice, caolín; (4) derivados de saponina tales como Stimulon™ o partículas generadas a partir de la misma tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes); (5) citocinas tales como interleucinas, interferones, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF) ; (6) otras sustancias tales como polinucleótidos de carbono, es decir, poli IC y poli AU, toxina de la cólera desintoxicada (CTB) y toxina lábil al calor de *E. coli* para la inducción de inmunidad mucosa; (7) liposomas. Una descripción más detallada de adyuvantes está disponible en una revisión por M. Z. I Khan y col. en *Pharmaceutical Research*, vol. 11, nº 1 (1994) pp2-11, y también en otra revisión por Gupta y col., en *Vaccine*, vol. 13, nº 14, pág. 1263-1276 (1995) y en el documento WO 99/24578. Adyuvantes preferidos incluyen QuilA™, QS21™, Alhydrogel™ y Adjuphos™.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden administrarse parenteralmente por inyección, infusión rápida, absorción nasofaríngea, dermoabsorción, o bucal o oral.

El término "composición farmacéutica" también pretende incluir anticuerpos. Según la presente divulgación, también se proporciona el uso de uno o más anticuerpos que tienen especificidad de unión por los polipéptidos de la presente invención para el tratamiento o la profilaxis de infección estreptocócica y/o enfermedades y síntomas mediados por infección estreptocócica.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para la profilaxis o el tratamiento de infección estreptocócica y/o enfermedades y síntomas mediados por infección estreptocócica como se describe en *Manual de Clinical Microbiology*, P.R. Murray (Ed, jefe), E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover y R.H. Tenover. ASM Press, Washington, D.C., séptima edición, 1999, 1773p.

En un aspecto, la invención proporciona el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 para el tratamiento profiláctico o terapéutico de infección por *Streptococcus* del grupo B en un huésped susceptible a infección por *Streptococcus* del grupo B. La invención proporciona además la vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19 para el tratamiento profiláctico o terapéutico de infección por *Streptococcus* del grupo B en un huésped susceptible a infección por *Streptococcus* del grupo B.

En un caso, las composiciones farmacéuticas se usan para la profilaxis o el tratamiento de septicemia, meningitis, neumonía, celulitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, epiglotitis.

En un aspecto, la invención proporciona el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 para el tratamiento profiláctico o terapéutico de septicemia, meningitis, neumonía, celulitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis o epiglotitis en un huésped. La invención proporciona además la vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19 para el tratamiento profiláctico o terapéutico de septicemia, meningitis, neumonía, celulitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis o epiglotitis en un huésped. En un caso, las composiciones farmacéuticas se usan para la profilaxis o el tratamiento de infección urinaria leve a septicemia y meningitis potencialmente mortales, que también incluye osteomielitis, endocarditis, amnionitis, endometritis, infecciones por heridas (postcesárea y postepisiotomía), celulitis, fascitis.

En un caso, las composiciones farmacéuticas se usan para la profilaxis o el tratamiento de bacteremia primaria, pero también piel de infección de tejido blando, neumonía, urosepticemia, endocarditis, peritonitis, meningitis, empiema. La piel de infecciones de tejido blando incluye celulitis, úlceras periféricas infectadas, osteomielitis, artritis séptica e infecciones por decúbito o por heridas.

En un caso, las composiciones farmacéuticas se usan para el tratamiento o la profilaxis de infección por *Streptococcus* y/o enfermedades y síntomas mediados por infección por *Streptococcus*, en particular *Streptococcus* del grupo B (GBS o *S. agalactiae*), *Streptococcus* del grupo A (*Streptococcus pyogenes*), *S. pneumoniae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. nocardia*, además de *Staphylococcus aureus*. En otra realización, la infección por *Streptococcus* es *Streptococcus* del grupo B (GBS o *S. agalactiae*).

En otro caso, la divulgación proporciona un procedimiento para la profilaxis o el tratamiento de infección por *Streptococcus* en un huésped susceptible a infección por *Streptococcus* que comprende administrar a dicho huésped una cantidad terapéutica o profiláctica de una composición de la invención.

En otro caso, la divulgación proporciona un procedimiento para la profilaxis o el tratamiento de infección por GBS en un huésped susceptible a infección por GBS que comprende administrar a dicho huésped una cantidad terapéutica o profiláctica de una composición de la invención.

En un caso particular, las composiciones farmacéuticas se administran a aquellos huéspedes en riesgo de infección por *Streptococcus* tales como lactantes, huéspedes ancianos e inmunodeprimidos.

Como se usa en la presente solicitud, el término "huésped" incluye animales. En otra realización, los animales son mamíferos. En otra realización, los animales son rebaños de ganado lechero. En otra realización, el mamífero es humano. En otra realización, el huésped es una mujer embarazada. En otra realización, el huésped es una mujer no

embarazada. En otra realización, el huésped es un neonato o un lactante.

Las composiciones farmacéuticas son preferentemente en forma de dosificación unitaria de aproximadamente 0,001 a 100 µg/kg (antígeno/peso corporal) y más preferentemente 0,01 a 10 µg/kg y lo más preferentemente 0,1 a 1 µg/kg, 1 a 3 veces, con un intervalo de aproximadamente 1 a 6 semanas entre inmunizaciones.

- 5 Las composiciones farmacéuticas son preferentemente en forma de dosificación unitaria de aproximadamente 0,1 µg a 10 mg y más preferentemente µg a 1 mg y lo más preferentemente 10 a 100 µg, 1 a 3 veces, con un intervalo de aproximadamente 1 a 6 semanas entre inmunizaciones.

10 Según otro aspecto de la divulgación se proporcionan polinucleótidos que codifican polipéptidos caracterizados por la secuencia de aminoácidos que comprende SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos de los mismos.

En una realización, los polinucleótidos son aquellos ilustrados en SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 que pueden incluir los marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican los polipéptidos de la invención, en tanto que éstos estén englobados por las reivindicaciones adjuntas.

- 15 Se apreciará que las secuencias de polinucleótidos ilustradas en las figuras pueden alterarse con codones degenerados y, sin embargo, codificar los polipéptidos de la invención. Por consiguiente, la presente invención proporciona además polinucleótidos que se hibridan con las secuencias de polinucleótidos en el presente documento anteriormente descritas (o las secuencias de complemento de la misma) que tienen al menos el 85 % de identidad entre secuencias. En una realización, al menos el 90 % de identidad entre secuencias. En una realización, al menos el 95 % de identidad. En otra realización, más del 97 % de identidad.

- 20 En otra realización, los polinucleótidos son hibridables bajo condiciones rigurosas.

Condiciones rigurosas adecuadas para la hibridación las puede determinar fácilmente un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y col., (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology*, (1999), editado por Ausubel F.M. y col., John Wiley & Sons, Inc., N.Y.).

- 25 “Condiciones rigurosas adecuadas” como se usa en el presente documento significa, por ejemplo, incubar una transferencia durante la noche (por ejemplo, al menos 12 horas) con una sonda de polinucleótidos larga en una disolución de hibridación que contiene, por ejemplo, aproximadamente 5X SSC, el 0,5 % de SDS, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y el 50 % de formamida, a 42 °C. Las transferencias pueden lavarse a condiciones de alta rigurosidad que permiten, por ejemplo, menos del 5 % de apareamiento de pb (por ejemplo, lavar dos veces en 0,1X SSC y el 0,1 % de SDS durante 30 min a 65 °C), seleccionándose así secuencias que tienen, por ejemplo, el 95 % o más de identidad de secuencias.

- 30 Otros ejemplos no limitantes de condiciones rigurosas adecuadas incluyen un lavado final a 65 °C en tampón acuoso que contiene NaCl 30 mM y el 0,5 % de SDS. Otro ejemplo de condiciones rigurosas adecuadas es hibridación en el 7 % de SDS, NaPO₄ 0,5 M, pH 7, EDTA 1 mM a 50 °C, por ejemplo, durante la noche, seguido de uno o más lavados con una disolución al 1 % de SDS a 42 °C. Aunque los lavados de alta rigurosidad pueden permitir menos de un 5 % de desapareamiento, condiciones de rigurosidad baja o reducida pueden permitir hasta el 20 % de desapareamiento de nucleótidos. La hibridación a baja rigurosidad puede llevarse a cabo como antes, pero usando menores condiciones de formamida, menores temperaturas y/o menores concentraciones de sales, además de periodos prolongados de tiempo de incubación.

- 40 En otra realización, la presente divulgación proporciona polinucleótidos que se hibridan bajo condiciones rigurosas con tanto

- (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido como con
- (b) el complemento de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido;

comprendiendo dicho polipéptido SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos del mismo.

- 45 En otro caso, la presente divulgación proporciona polinucleótidos que se hibridan bajo condiciones rigurosas con tanto

- (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido como con
- (b) el complemento de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido;

comprendiendo dicho polipéptido SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20.

En el presente documento también se desvelan: polinucleótidos que se hibridan bajo condiciones rigurosas con tanto

- 50
- (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido como con
 - (b) el complemento de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido;

comprendiendo dicho polipéptido al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido que comprende SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos del mismo;

Polinucleótidos que se hibridan bajo condiciones rigurosas con tanto

- 5 (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido como con
(b) el complemento de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido;

comprendiendo dicho polipéptido al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido que comprende SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ó 20.

En otro caso, los polinucleótidos son aquellos que codifican polipéptidos de la invención ilustrados en SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o fragmentos o análogos de los mismos.

- 10 En otro caso, los polinucleótidos son aquellos ilustrados en SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 que codifican polipéptidos de la invención o fragmentos o análogos de los mismos.

En otro caso, los polinucleótidos son aquellos que codifican polipéptidos de la invención ilustrados en SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20.

- 15 En otro caso, los polinucleótidos son aquellos ilustrados en SEC ID N°: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 que codifican polipéptidos de la invención.

Como será fácilmente apreciado por un experto en la materia, los polinucleótidos incluyen tanto ADN como ARN.

La presente invención también incluye polinucleótidos complementarios a los polinucleótidos descritos en la presente solicitud.

- 20 En otro caso, los polinucleótidos que codifican polipéptidos de la invención, o fragmentos, análogos o derivados de los mismos, pueden usarse en un procedimiento de inmunización con ADN. Es decir, pueden incorporarse en un vector que es replicable y expresable tras la inyección, reduciéndose así el polipéptido antigénico *in vivo*. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden incorporarse en un vector de plásmido bajo el control del promotor del CMV que es funcional en células eucariotas. Preferentemente, el vector se inyecta intramuscularmente.

- 25 Según otro aspecto se proporciona un procedimiento para producir polipéptidos de la invención por técnicas recombinantes expresando un polinucleótido que codifica dicho polipéptido en una célula huésped y recuperando el producto de polipéptido expresado. Alternativamente, los polipéptidos pueden producirse según técnicas químicas sintéticas establecidas, es decir, síntesis en fase de disolución o fase sólida de oligopéptidos que se ligan para producir el polipéptido completo (ligación en bloque).

- 30 Procedimientos generales para la obtención y evaluación de polinucleótidos y polipéptidos se describen en las siguientes referencias: Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, editado por Ausubel F.M. y col., John Wiley and Sons, Inc. New York; *PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering*, editado por White B.A., Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, 1997, 490 páginas; *Protein Purification, Principles and Practices*, Scopes R.K., Springer-Verlag, Nueva York, 3ª edición, 1993, 380 páginas; *Current Protocols in Immunology*, editado por Coligan J.E. y col.,
35 John Wiley & Sons Inc., Nueva York.

- Para la producción de recombinantes, células huésped se transfectan con vectores que codifican los polipéptidos de la invención y luego se cultivan en un medio nutritivo modificado según convenga para activar promotores, seleccionando transformantes o amplificando los genes. Vectores adecuados son aquellos que son viables y replicables en el huésped elegido e incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, por
40 ejemplo, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago. La secuencia de polipéptidos puede incorporarse en el vector en el sitio apropiado usando enzimas de restricción de forma que esté operativamente ligada a una región de control de la expresión que comprende un promotor, sitio de unión a ribosoma (región consenso o secuencia de Shine-Dalgarno), y opcionalmente un operador (elemento de control). Pueden seleccionarse componentes individuales de la región de
45 control de la expresión que sean apropiados para un huésped dado y vector según principios de biología molecular establecidos (Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, editado por Ausubel F.M. y col., John Wiley and Sons, Inc. Nueva York). Promotores adecuados incluyen, pero no se limitan a, LTR o promotor del SV40, lac de *E. coli*, tac o promotores de trp y el promotor del fago lambda P_L. Los vectores incorporan preferentemente un origen de replicación, además de
50 marcadores de selección, es decir, gen de resistencia a ampicilina. Vectores bacterianos adecuados incluyen pET, pQE70, pQE60, pQE-9, pD10, Phagescript, psix174, pBluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 y los vectores eucariotas pBlueBacIII, pWLNCO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG, pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL. Las células huésped pueden ser bacterianas, es decir, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*; fúngicas, es decir, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulins*; de levadura, es decir,
55 *Saccharomyces* o eucariotas, es decir, CHO, COS.

Tras la expresión del polipéptido en cultivo, las células se recogen normalmente por centrifugación, luego se rompen por medios físicos o químicos (si el polipéptido expresado no se secreta en los medios) y el extracto bruto resultante se conserva para aislar el polipéptido de interés. La purificación del polipéptido del medio de cultivo o lisado puede lograrse por técnicas establecidas dependiendo de las propiedades del polipéptido, es decir, usando precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía en hidroxilapatita y cromatografía en lectina. La purificación final puede lograrse usando HPLC.

Los polipéptidos pueden expresarse con o sin una secuencia conductora o de secreción. En el primer caso, el conductor puede eliminarse usando procesamiento postraduccional (véanse los documentos US 4.431.739; US 4.425.437; y US 4.338.397) o eliminarse químicamente posterior a la purificación del polipéptido expresado.

Según otro aspecto, los polipéptidos de la invención pueden usarse en una prueba de diagnóstico para infección por *Streptococcus*, en particular infección por *Streptococcus* del grupo B.

Varios procedimientos de diagnóstico son posibles, por ejemplo, la detección del organismo de *Streptococcus* en una muestra biológica previamente obtenida de un huésped puede seguirse el siguiente procedimiento:

- a) incubar un anticuerpo o fragmento del mismo reactivo con un polipéptido estreptocócico de la invención con la muestra biológica para formar una mezcla; y
- b) detectar anticuerpo específicamente unido o fragmento unido en la mezcla que indica la presencia de *Streptococcus*.

Tales procedimientos de diagnóstico están englobados por la invención, en tanto que éstos estén englobados por las reivindicaciones adjuntas.

Alternativamente, un procedimiento para la detección de anticuerpo específico para un antígeno de *Streptococcus*, y en particular antígeno de *Streptococcus* del grupo B, en una muestra biológica previamente obtenida de un huésped que contiene o del que se sospecha que contiene dicho anticuerpo puede realizarse del siguiente modo:

- a) incubar uno o más polipéptidos estreptocócicos de la invención o fragmentos de los mismos con la muestra biológica para formar una mezcla; y
- b) detectar anticuerpo específicamente unido o fragmento unido en la mezcla que indica la presencia de anticuerpo específico para *Streptococcus*. Tales procedimientos de diagnóstico están englobados por la invención, en tanto que éstos estén englobados por las reivindicaciones adjuntas.

Un experto en la materia reconocerá que esta prueba de diagnóstico puede tomar varias formas, que incluyen una prueba inmunológica tal como un ensayo de adsorción (ELISA), un radioinmunoensayo o un ensayo de aglutinación en látex, esencialmente para determinar si anticuerpos específicos para el polipéptido están presentes en un organismo.

Las secuencias de ADN que codifican polipéptidos de la invención también pueden usarse para diseñar sondas de ADN para su uso en detectar la presencia de *Streptococcus* en una muestra biológica de la que se sospecha que contiene tales bacterias. El procedimiento de detección de la presente invención comprende:

- a) obtener la muestra biológica de un huésped;
- b) incubar una o más sondas de ADN que tienen una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la invención o fragmentos del mismo con la muestra biológica para formar una mezcla; y
- c) detectar sonda de ADN específicamente unida en la mezcla que indica la presencia de bacterias *Streptococcus*.

Las sondas de ADN también pueden usarse para detectar *Streptococcus* en circulación, es decir, ácidos nucleicos de *Streptococcus* en una muestra, por ejemplo, usando una reacción en cadena de la polimerasa como procedimiento de diagnóstico de infecciones por *Streptococcus*. La sonda puede sintetizarse usando técnicas convencionales y puede inmovilizarse sobre una fase sólida, o puede marcarse con una marca detectable. Una sonda de ADN preferida es un oligómero que tiene una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 6 nucleótidos contiguos de los polipéptidos de *Streptococcus* de la invención.

Otro procedimiento de diagnóstico para la detección de *Streptococcus* en un huésped comprende:

- a) marcar un anticuerpo reactivo con un polipéptido de la invención o fragmento del mismo con una marca detectable;
- b) administrar el anticuerpo marcado o fragmento marcado al huésped; y
- c) detectar anticuerpo marcado específicamente unido o fragmento marcado en el huésped que indica la presencia de *Streptococcus*.

Otro aspecto de la divulgación es el uso de los polipéptidos de *Streptococcus* de la invención como inmunógenos para la producción de anticuerpos específicos para el diagnóstico y en particular el tratamiento de infección por

Streptococcus. Anticuerpos adecuados pueden determinarse usando procedimientos de cribado apropiados, por ejemplo, midiendo la capacidad de un anticuerpo particular para proteger pasivamente contra infección por *Streptococcus* en un modelo de prueba. Un ejemplo de un modelo animal es el modelo de ratón descrito en los ejemplos en el presente documento. El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina. El anticuerpo o fragmento puede ser de origen animal, específicamente de origen mamífero, y más específicamente de origen murino, de rata o humano. Puede ser un anticuerpo natural o un fragmento del mismo o, si se desea, un anticuerpo recombinante o fragmento de anticuerpo. El término anticuerpo recombinante o fragmento de anticuerpo significa anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se produjo usando técnicas de biología molecular. El anticuerpo o fragmentos de anticuerpos pueden ser policlonales, o preferentemente monoclonales. Puede ser específico para varios epítopes asociados a los polipéptidos de *Streptococcus*, pero es preferentemente específico para uno.

Otro aspecto desvelado en el presente documento es el uso de los anticuerpos dirigidos a los polipéptidos de la invención para la inmunización pasiva. Podrían usarse los anticuerpos descritos en la presente solicitud. Anticuerpos adecuados pueden determinarse usando procedimientos de cribado apropiados, por ejemplo, midiendo la capacidad de un anticuerpo particular para proteger pasivamente contra infección por *Streptococcus* en un modelo de prueba. Un ejemplo de un modelo animal es el modelo de ratón descrito en los ejemplos en el presente documento. El anticuerpo puede ser un anticuerpo completo o un fragmento de unión a antígeno del mismo y puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina. El anticuerpo o fragmento puede ser de origen animal, específicamente de origen mamífero, y más específicamente de origen murino, de rata o humano. Puede ser un anticuerpo natural o un fragmento del mismo o, si se desea, un anticuerpo recombinante o fragmento de anticuerpo. El término anticuerpo recombinante o fragmento de anticuerpo significa anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se produjo usando técnicas de biología molecular. El anticuerpo o fragmentos de anticuerpos pueden ser policlonales, o preferentemente monoclonales. Puede ser específico para varios epítopes asociados a los polipéptidos de *Streptococcus*, pero es preferentemente específico para uno.

El uso de un polinucleótido desvelado en el presente documento en inmunización genética empleará preferentemente un procedimiento o sistema de administración adecuado tal como inyección directa de ADN de plásmido en músculos [Wolf y col. H M G (1992) 1: 363; Turnes y col., Vaccine (1999), 17 : 2089; Le y col., Vaccine (2000) 18 : 1893; Alves y col., Vaccine (2001) 19 : 788], inyección de ADN de plásmido con o sin adyuvantes [Ulmer y col., Vaccine (1999) 18: 18; MacLaughlin y col., J. Control Release (1998) 56: 259; Hartikka y col., Gene Ther. (2000) 7: 1171-82; Benvenisty y Reshef, PNAS USA (1986) 83:9551; Singh y col., PNAS USA (2000) 97: 811], elección como diana de células por administración de ADN complejo con vehículos específicos [Wa y col., J Biol Chem (1989) 264: 16985; Chaplin y col., Infect. Immun. (1999) 67: 6434], inyección de plásmido complejo o encapsulado en diversas formas de liposomas [Ishii y col., AIDS Research and Human Retroviruses (1997) 13: 142; Perrie y col., Vaccine (2001) 19: 3301], administración de ADN con diferentes procedimientos de bombardeo [Tang y col., Nature (1992) 356: 152; Eisenbraun y col., DNA Cell Biol (1993) 12: 791; Chen y col., Vaccine (2001) 19: 2908] y administración de ADN con vectores vivos [Tubulekas y col., Gene (1997) 190: 191; Pushko y col., Virology (1997) 239: 389; Spreng y col. FEEM (2000) 27: 299; Dietrich y col., Vaccine (2001) 19: 2506].

En otro caso, la divulgación proporciona un procedimiento para tratamiento profiláctico o terapéutico de infección por *Streptococcus* en un huésped susceptible a infección por *Streptococcus* que comprende administrar al huésped una cantidad profiláctica o terapéutica de una composición farmacéutica de la invención.

En otra realización, la invención, en tanto que está englobada por las reivindicaciones adjuntas, proporciona el uso de un procedimiento farmacéutico para el tratamiento profiláctico o terapéutico de infección estreptocócica bacteriana en un huésped susceptible a infección estreptocócica que comprende administrar a dicho huésped una cantidad terapéutica o profiláctica de una composición de la invención.

En otra realización, la invención proporciona un kit que comprende un polipéptido de la invención para la detección o diagnóstico de infección estreptocócica.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto controlará la presente memoria descriptiva, que incluye definiciones.

Se entiende que la presente invención se refiere a SEC ID N°: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11 y 12.

Sin embargo, referencias a otros números de identificación de secuencias se mantienen en los siguientes ejemplos para ayudar en el entendimiento de la invención.

Ejemplo 1

Este ejemplo describe la clonación de productos génicos de *sip* truncados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la expresión de moléculas truncadas.

Los fragmentos del gen *sip* estreptocócico del grupo B (SEC ID N°: 42 del documento PCT WO 99/42588) se amplificaron por PCR (ciclador térmico de ADN GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer) de ADN genómico de la

5 cepa C388/90 estreptocócica del grupo B de serotipo la/c usando pares de cebadores de oligonucleótidos que
 contenían extensiones de bases para la adición de sitios de restricción y metionina (Tabla 1). La metionina se añadió
 para el polipéptido de Sip truncado del extremo C e interno. Los productos de PCR se purificaron en gel de agarosa
 usando un kit de extracción en gel QIAquick de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante, y se digirieron con
 10 endonucleasas de restricción. El vector pET (Novagen, Madison, WI) se digirió con las mismas endonucleasas y se
 purificó en gel de agarosa usando un kit de extracción en gel QIAquick de QIAGEN. Los productos de PCR digeridos
 se ligaron a uno de los siguientes plásmidos de expresión pET linealizados, pET21 o pET32. El producto ligado se
 transformó en la cepa DH5a de *E. coli* [F ϕ 80d/lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) deoR
 thi-1 phoA supE44 λ gyrA96 relA1] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) según las recomendaciones del fabricante. Los
 15 plásmidos pET recombinantes (rpET) que contenían fragmentos de genes *sip* se purificaron usando un kit de
 plásmidos QIAGEN y se secuenció su inserto de ADN (kit de secuenciación Taq Dye Deoxi Terminator Cycle, ABI,
 Foster City, CA). Cada una de las construcciones de plásmido resultantes se usó para transformar por
 electroporación (aparato Gene Pulser II, BIO-RAD Labs, Mississauga, Ontario, Canadá) la cepa de *E. coli*
 BL21(DE3) (F⁻ ompT hsdS_B(r_Bm_B) ga1 dcm (DE3)) o AD494 (DE3) [Δ ara-leu7697 Δ lacX74 Δ phoA PvuII phoR
 20 Δ malF3 F⁺ [lac⁺(lacI^f) pro] trxB: : Kan (DE3)] (Novagen). En estas cepas de *E. coli*, el promotor T7 que controla la
 expresión del polipéptido recombinante es específicamente reconocido por la T7 ARN polimerasa (presente en el
 profago λ DE3) cuyo gen está bajo el control del promotor lac que es inducible por IPTG. Los transformantes se
 cultivaron a 37 °C con agitación a 250 rpm en caldo LB (peptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l) que
 contenía 100 μ g de carbenicilina (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canadá) por ml hasta que la A₆₀₀
 25 alcanzó un valor de 0.6. Con el fin de inducir la producción de polipéptidos recombinantes de Sip truncados
 estreptocócicos del grupo B, las células se incubaron durante 3 horas adicionales en presencia de IPTG a una
 concentración final de 1 mM. Las células inducidas de un cultivo de 500 ml se sedimentaron por centrifugación y se
 congelaron a -80 °C. Los polipéptidos recombinantes expresados se purificaron de fracciones de sobrenadante
 obtenidas de centrifugación de cultivos de *E. coli* inducidos por IPTG sonificados usando una resina de quelación de
 metales unidos a His (QIAGEN, Chatsworth, CA). Los productos génicos generados se enumeran en la Tabla 2. Las
 cantidades de polipéptidos recombinantes obtenidas de la fracción soluble de *E. coli* se estimó por MicroBCA
 (Pierce, Rockford, Illinois).

Tabla 1. Lista de cebadores de oligonucleótidos de PCR

Cebador	Sitios de restricción	Secuencia 5' - 3'	SEC ID N°
DMAR41	<i>NcoI</i>	catgcatggcagggctccaacctcatgtt	21
DMAR54	<i>NcoI</i>	catgcatggcagctaataaacaggtatcaacagc	22
DMAR55	<i>XhoI</i>	gaaactcgagtgcatcttcaggatgtgcagctac	23
DMAR207	<i>BglII</i>	gccagatctgggtaaaaaccaagcactgg	24
DMAR208	<i>BglII</i>	gccagatctggttatctggcaacaaaagtttac	25
DMAR1451	<i>HindIII</i>	cgggaagcttattattgttaaatgatcgtgaaca	26
DMAR1452	<i>NcoI</i>	caagccatgggtatgacaccagaagcagcaaca	27
DMAR1453	<i>XhoI</i>	accgctcgagttgttaaatgatcgtgaacatggta	28
DMAR1454	<i>NcoI</i>	ccatccatggctcagtcagtcacaacagtatcaccag	29
DMAR1455	<i>NcoI</i>	aatgcatggttctgtgactacgacttcaacagc	30
DMAR1456	<i>XhoI</i>	aactcgaggctgctaacccttaccatgatcacct	31
DMAR1457	<i>NdeI</i>	atgggaattccatatgaaaatgaataaaaagggtactat tgacatc	32
DMAR1458	<i>XhoI</i>	atagctcgagtgacgtctgagttggttaacttcc	33

Tabla 2. Listas de productos génicos de sip truncados generados a partir de la cepa C388/90 de GBS

Designación de polipéptidos	Conjuntos de cebadores de PCR	Identificación (aminoácidos codificados)	Vector de clonación
Δsip-1	DMAR1457-DMAR1458	Extremo N' de Sip (1-214)	pET-21a(+)
ΔSip-2	DMAR1453-DMAR1454	Extremo C' de Sip (215-434)	pET-21d(+)
ΔSip-3	DMAR1452-DMAR1453	Extremo C' de Sip (146-434)	pET-21d(+)
ΔSip-4	DMAR1453-DMAR1455	Extremo C' de Sip (272-434)	pET-21d(+)
ΔSip-5	DMAR1456-DMAR1457	Extremo N' de Sip (1-360)	pET-21a(+)
ΔSip-6	DMAR1453-DMAR54	Extremo N' de Sip (184-434)	pET-21d(+)
ΔSip-7	DMAR1452-DMAR55	Interno a Sip (146-322)	pET-21d(+)
ΔSip-8	DMAR1453-DMAR41	Extremo C' de Sip (322-434)	pET-21d(+)
ΔSip-9	DMAR207-DMAR1451	Extremo C' de Sip (366-434)	pET-32a(+)
ΔSip-10	DMAR208-DMAR1451	Extremo C' de Sip (391-434)	pET-32a(+)

Ejemplo 2

5 Este ejemplo ilustra la reactividad de los polipéptidos recombinantes de Sip truncados marcados con His con anticuerpos presentes en sueros humanos.

10 Como se muestra en la Tabla 3, los polipéptidos recombinantes marcados con His ΔSip-2 (215-434), ΔSip-3 (146-434) y ΔSip-4 (272-434) fueron mejor reconocidos en inmunotransferencias por los anticuerpos presentes en el conjunto de sueros humanos. Esto es un resultado importante, ya que indica claramente que seres humanos que están normalmente en contacto con GBS desarrollan anticuerpos que son específicos para la porción del extremo C del polipéptido (aa 215-434). Estos anticuerpos humanos particulares podrían participar en la protección contra infección por GBS.

Tabla 3. Reactividad en inmunotransferencias de anticuerpos presentes en sueros humanos con polipéptidos de Sip truncados.

I.D. de polipéptido recombinante purificado ¹	Reactividad con sueros humanos ²
Sip (1-434)	+++
ΔSip-1 (1-214)	+
ΔSip-2 (215-434)	+++
ΔSip-3 (146-434)	+++
ΔSip-4 (272-434)	++
ΔSip-5 (1-360)	+

¹ Polipéptidos recombinantes marcados con His producidos y purificados como se describe en el Ejemplo 1 se usaron para realizar las inmunotransferencias.
² Sueros recogidos de seres humanos se reunieron y se diluyeron 1/500 para realizar las inmunotransferencias.

15 Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la unión en la superficie de células de GBS intactas de anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de Sip truncados.

Se cultivaron células bacterianas a la fase exponencial temprana en caldo Todd-Hewitt (THB: Difco Laboratories, Detroit, Mich.) y la DO_{600nm} se ajustó con THB a 0,15 (correspondiente a $\sim 10^8$ UFC/ml). Diez μ l de sueros específicos para Sip truncados o de control de ratón se añadieron a 1 ml de la suspensión bacteriana. Los tubos que contenían las suspensiones bacterianas y de suero se incubaron durante 2 h a 4 °C bajo rotación suave. Las muestras se lavaron 3 veces en tampón de bloqueo [solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía el 2 % (peso/vol) de albúmina de suero bovino (BSA: Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)] y luego se añadió 1 ml de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG + IgM de ratón conjugada con fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Mississauga, Ontario, Canadá) diluido en tampón de bloqueo. Después de otra incubación de 60 min a temperatura ambiente, las muestras se lavaron 3 veces en tampón de bloqueo y se fijaron con el 0,3 % de formaldehído en tampón PBS durante 18 h a 4 °C. Las células se lavaron 2 veces en tampón PBS y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón PBS. Las células se mantuvieron en la oscuridad a 4 °C hasta que se analizaron por citometría de flujo (Epics® XL; Beckman Coulter Inc., Fullerton, Calif.).

El análisis de citometría de flujo reveló que los anticuerpos específicos para Δ Sip-2 (215-434), Δ Sip-3 (146-434) y Δ Sip-4 (272-434) reconocieron eficientemente sus epítopes expuestos en la superficie correspondiente en la cepa de GBS homóloga (C388/90) probada (Tabla 4). Se determinó que más del 90 % de las 10.000 células de GBS analizadas se marcaron con los anticuerpos presentes en estos sueros. Además, los anticuerpos presentes en el conjunto de sueros específicos para Δ Sip-2 (215-434), Δ Sip-3 (146-434) y Δ Sip-4 (272-434) unidos en la superficie de la cepa NCS 954 de GBS de serotipo III (Tabla 4). También se determinó que más del 80 % de las 10.000 células de esta cepa se marcaron por los anticuerpos específicos. Estas observaciones demuestran claramente que la porción del extremo C del polipéptido de Sip es accesible a la superficie, en la que puede ser fácilmente reconocida por anticuerpos. Se mostró que los anticuerpos anti-GBS desempeñaban una función importante en la protección contra infección por GBS. De hecho, los inventores han demostrado que los anticuerpos específicos para Sip cruzan eficientemente la barrera transplacentaria y, por tanto, confieren inmunidad protectora contra infecciones por GBS (Martin y col. Abstr. 101th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. 2001).

Tabla 4. Evaluación de la unión de anticuerpos específicos para Sip truncados en la superficie de células de GBS intactas.

Identificación del suero ¹	Cepa C388	8/90 (Ia/c)	Cepa NCS	954 (III)
	% de células marcadas ²	Índice de fluorescencia ³	% de células marcadas	Índice de fluorescencia
Conjunto de sueros específicos para Δ Sip-1	5,1	1,2	10,0	1,6
Conjunto de sueros específicos para Δ Sip-2	95,6	18,7	87,7	14,2
Conjunto de sueros específicos para Δ Sip-3	96,0	19,4	87,7	13,3
Conjunto de sueros específicos para Δ Sip-4	94,2	17,2	84,2	11,6
Conjunto de sueros específicos para Δ Sip-5	21,6	2,2	5,2	1,3
Conjunto de suero positivo para control ⁴	95,4	24,1	85,4	12,3
Conjunto de suero positivo para control ⁵	1,0	1,0	1,0	1,0

¹ A los ratones se les inyectaron subcutáneamente tres veces a intervalos de tres semanas 20 μ g de polipéptidos recombinantes purificados mezclados con 20 μ g de adyuvante QuilA. Los sueros se diluyeron 1/100.

² % de células marcadas de las 10.000 células analizadas.

³ El índice de fluorescencia se calculó como la mediana del valor de fluorescencia obtenido después de marcar las células con un suero inmune dividido entre el valor de fluorescencia obtenido para un suero de ratón de control. Un valor de fluorescencia de 1 indicó que no hubo unión de anticuerpos en la superficie de células de GBS intactas.

⁴ Suero obtenido de un ratón inmunizado con 20 μ g de polipéptido de Sip purificado a partir de la cepa C388/90 de GBS se diluyó 1/100 y se usó como control positivo para el ensayo.

⁵ Sueros recogidos de ratones sin inmunizar e inmunizados de referencia se reunieron, se diluyeron 1/100 y se usaron como controles negativos para este ensayo.

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra la protección de ratones contra infección estreptocócica del grupo B mortal inducida por inmunización con polipéptidos recombinantes de Sip truncados purificados.

5 Grupos de 8 ratones CD-1 hembra (Charles River) se inmunizaron subcutáneamente tres veces a intervalos de tres semanas con 20 µg de polipéptidos de Sip truncados que se produjeron y se purificaron como se ha descrito en el Ejemplo 1 en presencia de 20 µg de adyuvante QuilA (Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Ontario, Canadá). Los ratones de control se inyectaron con adyuvante QuilA solo en PBS. Las muestras de sangre se recogieron del seno orbital en el día 1, 21 y 42 antes de cada inmunización y 14 días (día 56) tras la tercera inyección. Unas semanas después, los ratones se expusieron a aproximadamente 3×10^5 UFC de la cepa C388/90 estreptocócica del grupo B (la/c). Las muestras de inóculo de exposición estreptocócica del grupo B se sembraron en placa sobre placas de agar sangre para determinar la UFC y para verificar la dosis de exposición. Las muertes se registraron durante un periodo de 7 días. Más del 60 % de los ratones inmunizados con los polipéptidos recombinantes de tanto ΔSip-2 (215-434), ΔSip-3 (146-434), ΔSip-4 (272-434) como ΔSip-6 (184-434) se protegieron de una exposición letal a GBS. Por el contrario, la inmunización de ratones con adyuvante solo, ΔSip-1 (1-214) o ΔSip-5 (1-360) no confirió tal protección (Tabla 5). Se mostró que la tasa de supervivencia determinada para los grupos de ratones inmunizados con ΔSip-2 (215-434), ΔSip-3 (146-434), ΔSip-4 (272-434) y ΔSip-6 (184-434) era estadísticamente diferente del grupo de control por la prueba exacta de Fisher.

Tabla 5. Capacidad de polipéptidos de Sip truncados recombinantes para provocar protección contra la cepa C388/90 de GBS (la/c)

Grupos	Nº ratones supervivientes	% de supervivencia
ΔSip-1 (1-214)	0/5	0
ΔSip-2 (215-434)	3/5	60*
ΔSip-3 (146-434)	3/5	60*
ΔSip-4 (272-434)	3/4	75*
ΔSip-5 (1-360)	2/5	40
ΔSip-6 (184-434)	7/8	88*
QuilA	0/5	0

* Prueba exacta de Fisher; $p < 0,05$

Ejemplo 5

Este ejemplo describe el aislamiento de anticuerpos monoclonales (Mab) y el uso de estos Mab para caracterizar los epítopes de polipéptidos de Sip.

25 Ratones CD1 hembra (Charles River) se inmunizaron subcutáneamente con el producto génico Δsip-3 de la cepa C388/90 de GBS en presencia de 20 µg de adyuvante QuilA (Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canadá). Un grupo de ratones se inmunizaron tres veces a intervalos de tres semanas con 20 µg de polipéptido de ΔSip-3 purificado por afinidad. Tres a cuatro días antes de la fusión, los ratones se inyectaron intravenosamente con 10 µg del antígeno respectivo suspendido en PBS solo. Se produjeron hibridomas por fusión de células del bazo con células de mieloma SP2/0 no secretantes como se ha descrito previamente por Hamel y col. [J. Med. Microbiol., 23, pág. 163-170 (1987)]. Los sobrenadantes de cultivo de hibridomas se cribaron inicialmente por enzimoimmunoanálisis según el procedimiento descrito por Brodeur y col. (2000) usando placas recubiertas con preparaciones de polipéptidos recombinantes purificados o suspensiones de células de GBS destruidas por calor. Entonces, los hibridomas positivos seleccionados basándose en reactividad de ELISA con una variedad de antígenos se clonaron por diluciones limitantes, se expandieron y se congelaron.

35 Los hibridomas se probaron mediante ELISA e inmunotransferencia Western contra productos génicos sip, y por ensayo de citofluorometría contra la cepa C388/90 de GBS (serotipo la/c) con el fin de caracterizar los epítopes reconocidos por los Mab. Los resultados obtenidos de los estudios de inmunorreactividad de los Mab (Tabla 6 y Tabla 7) están de acuerdo con la accesibilidad superficial obtenida con polipéptidos de Sip truncados. De hecho, los Mab más accesibles reconocieron la región del extremo C (215-434) del polipéptido de Sip. Particularmente, los datos revelaron la presencia de al menos cuatro epítopes expuestos a la superficie y potencialmente protectores distintos sobre el polipéptido de Sip. Se localizó que estas regiones se localizaban en los aminoácidos 215-272, 272-322, 360-366 y 391-434. Por el contrario, los epítopes localizados en la porción del extremo N que comprende los aminoácidos 1 a 214 fueron internos y no accesibles a los anticuerpos.

Tabla 6. Reactividad de Mab inmunorreactivos con Sip con un panel de productos génicos sip.

Mab	Sip	Δ Sip-1 (aa 1-214)	Δ Sip-2 (aa 215-434)	Δ Sip-3 (aa 146-434)	Δ Sip-4 (aa 272-434)	Δ Sip-5 (aa 1-360)	Δ Sip-6 (aa 184-434)	Δ Sip-7 (aa 146-322)	Δ Sip-8 (aa 322-434)	Δ Sip-9 (aa 366-434)	Δ Sip-10 (aa 391-434)
1F7	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
3B7	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
4F2	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
5E5	+	+	-	+	-	+	+	+	-	NP*	NP
5F11	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
6F3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	NP	NP
8E3	+	-	+	+	+	+	+	+	-	NP	NP
8F6	+	+	-	+	-	+	-	+	-	NP	NP
9C7	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
11C9	+	-	+	+	+	+	+	+	-	NP	NP
11D2	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
11E10	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
12G10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	NP	NP
13D12	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
14A2	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
14H4	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
14H8	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
17C10	+	+	-	+	-	+	-	+	-	NP	NP
18A8	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
18H10	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
20A2	+	-	+	+	-	+	+	+	-	NP	NP
20G5	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-

*NP: no probado.

ES 2 381 967 T3

Tabla 7. Evaluación de la unión de Mab inmunorreactivos con Sip en la superficie de células de GBS intactas.

Mab	Epítotope reconocido (aa) ¹	% de células marcadas ²	Índice de fluorescencia ³
17C10	146-184	0,7	1,6
8F6	146-184	1,1	1,8
5E5	184-215	5,7	1,9
12G10	215-272	42,1	7,1
20A2	215-272	1,1	1,8
6F3	272-322	25,6	4,9
8E3	272-322	28,6	5,2
11C9	272-322	39,7	5,8
1F7	360-366	78,9	7,5
4F2	360-366	97,9	7,2
5F11	360-366	43,1	2,2
9C7	360-366	93,8	6,1
11D2	360-366	87,1	11,9
11E10	360-366	45,8	2,3
14H8	360-366	90,8	4,8
18H10	360-366	98,0	8,4
20G5	360-366	96,5	6,9
3B7	391-434	98,3	10,4
13D12	391-434	90,0	10,4
14A2	391-434	98,4	10,8
14H4	391-434	97,5	10,0
18A8	391-434	97,7	11,7
Mab de control negativo ⁴	-	1,5	1,0
Conjunto de suero de control positivo ⁵	-	98,7	25,0

¹ Los epítotope se han determinado por la reactividad de Mab con polipéptidos de Sip truncados (véase la tabla 6).

² % de células marcadas de las 10.000 células analizadas.

³ El índice de fluorescencia se calculó como la mediana del valor de fluorescencia obtenido después de marcar las células con un Mab o suero inmune dividido entre el valor de fluorescencia obtenido para un Mab de control. Un valor de fluorescencia de 1 indicó que no hubo unión de anticuerpos en la superficie de células de GBS intactas.

⁴ Mab irrelevante no se diluyó y se usó como controles negativos para este ensayo.

⁵ Suero obtenido de un ratón inmunizado con 20 µg de polipéptido de Sip purificado a partir de la cepa C388/90 de GBS se diluyó 1/100 y se usó como control positivo para el ensayo.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la protección de ratones contra infección estreptocócica del grupo B mortal inducida por inmunización pasiva con Mab específicos para Sip.

5 El potencial protector de Mab específicos para Sip para proteger neonatos contra infección se evaluó mediante administración pasiva de anticuerpos Mab semi-purificados. Ratones preñados en el día 16 de gestación se inyectaron intravenosamente (i.v.) con 500 µl de anticuerpos Mab semi-purificados o anticuerpos específicos para Sip de conejo parcialmente purificados. Seis ratones preñados de control recibieron el mismo volumen de Mab irrelevante semi-purificado. Las crías se expusieron subcutáneamente (s.c.) entre 24 h y 48 h después del nacimiento a una dosis letal de $3-4 \times 10^4$ ufc de la cepa C388/90 de GBS de serotipo la/c. Los datos de supervivencia se presentan en la Tabla 8. La administración a los ratones preñados de una combinación de dos Mab específicos para Sip, 6F3 y 11D2 protegió el 65 % (15/23) de la crías de una exposición a GBS letal. No se observó supervivencia comparable de las crías cuando los ratones preñados recibieron un Mab específico para Sip.

Tabla 8. Protección pasiva de ratones neonatales contra la exposición a la cepa C388/90 de GBS de serotipo la/c.

Tratamiento de madres (n) ¹	Supervivencia en crías (%) ²
6F3 (5)	3/52 (6)
11D2 (2)	3/14 (21)
6F3-11D2 (2)	15/23 (65)
Anti-suero de Sip de conejo (4) ¹	37/38 (97)
Mab irrelevante (6)	0/69 (0)

¹ Un volumen máximo de 500 µl de anticuerpos semi-purificados se administraron i.v. a ratones preñados en el día 16 de gestación. Cuando una combinación de dos Mab se administró pasivamente a los ratones preñados, 250 µl de cada Mab se reunieron juntos antes de la inyección.

² El número de supervivientes se siguió durante 7 días después de la exposición. Las crías se expusieron s.c. a 50 µl que contenían $3-4 \times 10^4$ ufc de la cepa C388/90 de GBS de serotipo la/c entre 24 y 48 h después del nacimiento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 85 % a la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12, en el que el polipéptido codificado conserva la capacidad de producir anticuerpos que tienen especificidad de unión para *Streptococcus* del grupo B.
2. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido codificado consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 90 % a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12.
- 10 3. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido codificado consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 95 % a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12.
4. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido codificado consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 99 % a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12.
- 15 5. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido codificado consiste en la secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12.
6. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1 que consiste en una secuencia de nucleótidos elegida de: SEC ID N°: 3, 5, 7 y 11.
- 20 7. Un polinucleótido aislado que es complementario al polinucleótido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un vector que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho polinucleótido está operativamente ligado a una región de control de la expresión.
9. Una célula huésped transfectada con el vector de la reivindicación 8.
- 25 10. Un procedimiento para producir un polipéptido que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 9 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido.
11. Un polipéptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 85 % a la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12, en el que el polipéptido conserva la capacidad de producir anticuerpos que tienen especificidad de unión para *Streptococcus* del grupo B.
- 30 12. El polipéptido de la reivindicación 11 que consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 90 % a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12.
13. El polipéptido de la reivindicación 11 que consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 95 % a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12.
14. El polipéptido aislado de la reivindicación 11 que consiste en una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 99 % a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12.
- 35 15. El polipéptido aislado de la reivindicación 11 que consiste en la secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12.
16. Un polipéptido de fusión que comprende el polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 11-15.
- 40 17. Un polipéptido quimérico que comprende dos o más polipéptidos, en el que cada uno de los dos o más polipéptidos consiste en una secuencia de aminoácidos elegida de SEC ID N°: 4, 6, 8 y 12, siempre que los dos o más polipéptidos estén ligados de manera que formen un polipéptido quimérico.
18. Una vacuna que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 y un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptables.
19. Una vacuna que comprende el polipéptido de fusión según la reivindicación 16 o el polipéptido quimérico de la reivindicación 17 y un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptables.
- 45 20. Un procedimiento para la detección de un anticuerpo específico para antígeno de *Streptococcus* del grupo B en una muestra biológica previamente obtenida de un huésped, que comprende:
 - (a) incubar uno o más de los polipéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16 con la muestra biológica para formar una mezcla; y

(b) detectar un polipéptido específicamente unido en la mezcla que indica la presencia de un anticuerpo específico para el antígeno de *Streptococcus* del grupo B en la muestra.

21. La vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19 para el tratamiento profiláctico o terapéutico de infección por *Streptococcus* del grupo B en un huésped susceptible a infección por *Streptococcus* del grupo B.
- 5 22. La vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 19 para el tratamiento profiláctico o terapéutico de septicemia, meningitis, neumonía, celulitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis o epiglotitis en un huésped.
23. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 para el tratamiento profiláctico o terapéutico de infección por *Streptococcus* del grupo B en un huésped susceptible a infección por *Streptococcus* del grupo B.
- 10 24. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 para el tratamiento profiláctico o terapéutico de septicemia, meningitis, neumonía, celulitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis o epiglotitis en un huésped.
25. La vacuna de la reivindicación 21 o la reivindicación 22 o el polipéptido de la reivindicación 23 o la reivindicación 24 en la que el huésped es un animal.
26. La vacuna de la reivindicación 21 o la reivindicación 22 o el polipéptido de la reivindicación 23 o la reivindicación 24 en la que el huésped se elige de un rebaño de ganado lechero.
- 15 27. La vacuna de la reivindicación 21 o la reivindicación 22 o el polipéptido de la reivindicación 23 o la reivindicación 24 en la que el huésped es un ser humano.
28. Uso del polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 en la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de septicemia, meningitis, neumonía, celulitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis o epiglotitis.
- 20 29. Uso del polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 en la preparación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de infección por *Streptococcus* del grupo B en un huésped susceptible a infección por *Streptococcus* del grupo B.
30. Un kit que comprende el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 para la detección o el diagnóstico de infección por *Streptococcus* del grupo B.

Figura 1 (SEC ID N°: 1)

```

1 ATGAAAATGA ATAAAAAGGT ACTATTGACA TCGACAATGG CAGCTTCGCT ATTATCAGTC
61 GCAAGTGTTT AAGCACAAGA AACAGATACG ACGTGGACAG CACGTAAGTGT TTCAGAGGTA
121 AAGGCTGATT TGGTAAAGCA AGACAATAAA TCATCATATA CTGTGAAATA TGGTGATACA
181 CTAAGCGTTA TTTCAGAAGC AATGTCAATT GATATGAATG TCTTAGCAAA AATTAATAAC
241 ATTGCAGATA TCAATCTTAT TTATCCTGAG ACAACACTGA CAGTAAGTGT CGATCAGAAG
301 AGTCATACTG CCACTTCAAT GAAAATAGAA ACACCAGCAA CAAATGCTGC TGGTCAAACA
361 ACAGCTACTG TGGATTTGAA AACCATCAA GTTTCTGTTG CAGACCAAAA AGTTTCTCTC
421 AATACAATTT CGGAAGGTAT GACACCAGAA GCAGCAACAA CGATTGTTTC GCCAATGAAG
481 ACATATTCTT CTGCGCCAGC TTTGAAATCA AAAGAAGTAT TAGCACAAGA GCAAGCTGTT
541 AGTCAAGCAG CAGCTAATGA ACAGGTATCA ACAGCTCCTG TGAAGTCGAT TACTTCAGAA
601 GTTCCAGCAG CTAAAGAGGA AGTTAAACCA ACTCAGACGT CA

```

Figura 2 (SEC ID N°: 2)

```

1 MKMKNKVLTT STMAASLLSV ASVQAQETDT TWTARTVSEV KADLVKQDNK SSVTVKYGDT
61 LSVISEAMSI DMNVLAKINN IADINLIYPE TPLTVTYDQK SHTATSMKIE TPATNAAGQT
121 TATVDLKTNQ VSVADQKVSF NTISEGMTPE AATTIVSPMK TYSSAPALKS KEVLAQEQAV
181 SQAAANEQVS TAPVKSITSE VPAAKEEVKP TQTS

```

Figura 3 (SEC ID N°: 3)

```

1 GTCAGTCAGT CAACAACAGT ATCACCAGCT TCTGTTGCCG CTGAAACACC AGCTCCAGTA
61 GCTAAAGTAG CACCGGTAAG AACTGTAGCA GCCCCTAGAG TGGCAAGTGT TAAAGTAGTC
121 ACTCCTAAG TAGAACTGG TGCATACCA GAGCATGTAT CAGCTCCAGC AGTTCCCTGTG
181 ACTACGACTT CAACAGCTAC AGACAGTAAG TTACAAGCGA CTGAAGTTAA GAGCGTTCCG
241 GTAGCACAAA AAGCTCCAAC AGCAACACCG GTAGCACAA CAGCTTCAAC AACAAATGCA
301 GTAGCTGCAC ATCCTGAAAA TGCAGGGCTC CAACCTCATG TTGCAGCTTA TAAAGAAAAA
361 GTAGCGTCAA CTTATGGAGT TAATGAATTC AGTACATACC GTGCAGGTGA TCCAGGTGAT
421 CATGGTAAAG GTTTAGCAGT CGACTTTATT GTAGGTAAAA ACCAAGCACT TGGTAATGAA
481 GTTGCACAGT ACTCTACACA AAATATGGCA GCAAATAACA TTTCATATGT TATCTGGCAA
541 CAAAAGTTTT ACTCAAATAC AAATAGTATT TATGGACCTG CTAATACTTG GAATGCAATG
601 CCAGATCGTG GTGGCGTTAC TGCCAACCAT TATGACCATG TTCACGTATC ATTTAACAAA

```

Figura 4 (SEC ID N°: 4)

```

1 VSQSTMVSPA SVAAETPAV AKVAPVRTVA APRVASVKVV TPKVETGASP EHVSAVAVPV
61 TTTSTATDSK LQATEVKSVP VAQKAPTATP VAQPASTTNA VAAHPENAGL QPHVAAYKEK
121 VASTYGVNEF STYRAGDPGD HGKGLAVDFI VGKNQALGNE VAQYSTQNMA ANNISYVIWQ
181 QKFYSNTNSI YGPANTWNAM PDRGGVTANH YDHVHVSFNK

```

Figura 5 (SEC ID N°: 5)

```

1 GGTATGACAC CAGAAGCAGC AACAAACGATF GTTTCGCCAA TGAAGACATA TTCTTCTGCG
61 CCAGCTTTGA AATCAAAAAGA AGTATTAGCA CAAGAGCAAG CTGTTAGTCA AGCAGCAGCT
121 AATGAACAGG TATCAACAGC TCCTGTGAAG TCGATTACTT CAGAAGTTCC AGCAGCTAAA
181 GAGGAAGTTA AACCAACTCA GACGTCAGTC AGTCAGTCAA CAACAGTATC ACCAGCTTCT
241 GTTGCCGCTG AACACCAGC TCCAGTAGCT AAAGTAGCAC CGGTAAGAAC TGTAGCAGCC
301 CCTAGAGTGG CAAGTGTTAA AGTAGTCACT CCTAAAGTAG AAACGGTGC ATCACCAGAG
361 CATGTATCAG CTCCAGCAGT TCCTGTGACT ACGACTTCAA CAGCTACAGA CAGTAAGTTA
421 CAAGCGACTG AAGTTAAGAG CGTTCGGTA GCACAAAAG CTCCAACAGC AACACCGGTA
481 GCACAACCAG CTTCAACAAC AAATGCAGTA GCTGCACATC CTGAAAATGC AGGGCTCCAA
541 CCTCATGTTG CAGCTTATAA AGAAAAAGTA GCGTCAACTT ATGGAGTTAA TGAATTCAGT
601 ACATACCGTG CAGGTGATCC AGGTGATCAT GGTAAAGGTT TAGCAGTCGA CTTTATTGTA
661 GGTAAAAACC AAGCACTTGG TAATGAAGTT GCACAGTACT CTACACAAA TATGGCAGCA
721 AATAACATTT CATATGTTAT CTGGCAACAA AAGTTTTACT CAAATACAAA TAGTATTTAT
781 GGACCTGCTA ATACTTGGAA TGCAATGCCA GATCGTGGTG GCGTACTGC CAACCATTAT
841 GACCATGTTC ACGTATCATT TAACAAA

```

Figura 6 (SEC ID N°: 6)

```

1 GMTPEAATTI VSPMKTYSSA PALKSKEVLA QEQAVSQAAA NEQVSTAPVK SITSEVPAAK
61 EEVKPTQTSV SQSTTVSPAS VAAETPAPVA KVAPVRTVAA PRVASVKVVT PKVETGASPE
121 HVSAPAVPVT TTSTATDSKL QATEVKSVPV AOKAPTATPV AQPASTTNAV AAHPENAGLQ
181 PHVAAYKEKV ASTYGVNEFS TYRAGDPGDH GKGLAVDFIV GKNQALGNEV AQYSTQNMMA
241 NNISYVIWQQ KFYSNTNSIY GPANTWNAMP DRGGVTANHY DHVHVSEFNK

```

Figura 7 (SEC ID N°: 7)

```

1 GTTCCTGTGA CTACGACTTC AACAGCTACA GACAGTAAGT TACAAGCGAC TGAAGTTAAG
61 AGCGTTCGG TAGCACAAA AGCTCCAACA GCAACACCGG TAGCACACC AGCTTCAACA
121 ACAAATGCAG TAGCTGCACA TCCTGAAAAT GCAGGGCTCC AACCTCATGT TGCAGCTTAT
181 AAAGAAAAAG TAGCGTCAAC TTATGGAGTT AATGAATTCA GTACATACCG TGCAGGTGAT
241 CCAGGTGATC ATGGTAAAGG TTTAGCAGTC GACTTTATTG TAGGTAAAA CCAAGCACTT
301 GGTAATGAAG TTGCACAGTA CTCTACACAA AATATGGCAG CAAATAACAT TTCATATGTT
361 ATCTGGCAAC AAAAGTTTFA CTCAAATACA AATAGTATTT ATGGACCTGC TAATACTTGG
421 AATGCAATGC CAGATCGTGG TGGCGTACT GCCAACCATT ATGACCATGT TCACGTATCA
481 TTTAACAAA

```

Figura 8 (SEC ID N°: 8)

```

1 VPVTTTSTAT DSKLQATEVK SVPVAQKAPT ATPVAQPAST TNAVAHPEN AGLQPHVAAY
61 KEKVASTYGV NEFSTYRAGD PGDHGKGLAV DFIVGKNQAL GNEVAQYSTQ MMAANNISYV
121 IWQQKFYSNT NSIYGPANTW NAMPDRGGVT ANHYDHVHVS FNK

```

Figura 9 (SEC ID N°: 9)

```

1 ATGAAAATGA ATAAAAAGGT ACTATTGACA TCGACAATGG CAGCTTCGCT ATTATCAGTC
61 GCAAGTGTTT AAGCACAAGA AACAGATACG ACGTGGACAG CACGTACTGT TTCAGAGGTA
121 AAGGCTGATT TGGTAAAGCA AGACAATAAA TCATCATATA CTGTGAAATA TGGTGATACA
181 CTAAGCGTTA TTTCAGAAGC AATGTCAATT GATATGAATG TCTTAGCAAA AATTAATAAC
241 ATTGCAGATA TCAATCTTAT TTATCCTGAG ACAACACTGA CAGTAACTTA CGATCAGAAG
301 AGTCATACTG CCACTTCAAT GAAAATAGAA ACACCAGCAA CAAATGCTGC TGGTCAAACA
361 ACAGCTACTG TGGATTTGAA AACCAATCAA GTTCTGTGTTG CAGACCAAAA AGTTTCTCTC
421 AATACAATTT CGGAAGGTAT GACACCAGAA GCAGCAACAA CGATTGTTTC GCCAATGAAG
481 ACATATTCTT CTGCGCCAGC TTTGAAATCA AAAGAAGTAT TAGCACAAGA GCAAGCTGTT
541 AGTCAAGCAG CAGCTAATGA ACAGGTATCA ACAGCTCCTG TGAAGTCGAT TACTTCAGAA
601 GTTCCAGCAG CTAAAGAGGA AGTTAAACCA ACTCAGACGT CAGTCAGTCA GTCAACAACA
661 GTATCACCAG CTTCTGTTGC CGCTGAAACA CCAGCTCCAG TAGCTAAAGT AGCACCAGTA
721 AGAACTGTAG CAGCCCCTAG AGTGGCAAGT GTTAAAGTAG TCACTCCTAA AGTAGAACT
781 GGTGCATCAC CAGAGCATGT ATCAGCTCCA GCAGTTCCTG TGACTACGAC TTCAACAGCT
841 ACAGACAGTA AGTTACAAGC GACTGAAGTT AAGAGCGTTC CGGTAGCACA AAAAGCTCCA
901 ACAGCAACAC CGGTAGCACA ACCAGCTTCA ACAACAAATG CAGTAGCTGC ACATCTGAA
961 AATGCAGGGC TCCAACCTCA TGTTGCAGCT TATAAAGAAA AAGTAGCGTC AACTTATGGA
1021 GTTAATGAAT TCAGTACATA CCGTGCAGGT GATCCAGGTG ATCATGGTAA AGGTTTAGCA

```

Figura 10 (SEC ID N°: 10)

```

1 MKMKNKVLIT STMAASLLSV ASVQAQETDI TWTARTVSEV KADLVKQDNK SSYTVKYGDT
61 LSVISEAMSI DMNVLAKINN IADINLIYPE TTLTVTYDQK SHTATSMKIE TPATNAAGOT
121 TATVDLKTNQ VSVADQKVS LNTISEGMTPE AATTIVSPMK TYSSAPALKS KEVLAQEQAV
181 SQAAANEQVS TAPVKSITSE VPAAKEEVPK TQTSVSQSTT VSPASVAEET PAPVAKVAPV
241 RTVAAPRVAS VKVVTPKVET GASPEHVSAP AVPVTTTSTA TDSKLQATEV KSVVPAQKAP
301 TATPVAQPAS TTNAVAHPE NAGLQPHVAA YKEKVASTYG VNEFSTYRAG DPGDHGKGLA

```

Figura 11 (SEC ID N°: 11)

```

1 GCAGCTAATG AACAGGTATC AACAGCTCCT GTGAAGTCGA TTACTTCAGA AGTTCAGCA
61 GCTAAAGAGG AAGTTAAACC AACTCAGACG TCAGTCAGTC AGTCAACAAC AGTATCACCA
121 GCTTCTGTTG CCGCTGAAAC ACCAGCTCCA GTAGCTAAAG TAGCACCAGT AAGAAGTGT
181 GCAGCCCCTA GAGTGGCAAG TGTTAAAGTA GTCACTCCTA AAGTAGAAAC TGGTGCATCA
241 CCAGAGCATG TATCAGCTCC AGCAGTTCCT GTGACTACGA CTCAACAGC TACAGACAGT
301 AAGTTACAAG CGACTGAAGT TAAGAGCGTT CCGGTAGCAC AAAAAGCTCC AACAGCAACA
361 CCGGTAGCAC AACCAGCTTC AACACAAAT GCAGTAGCTG CACATCCTGA AAATGCAGGG
421 CTCCAACCTC ATGTTGCAGC TTATAAAGAA AAAGTAGCGT CAACTTATGG AGTTAATGAA
481 TTCAGTACAT ACCGTGCAGG TGATCCAGGT GATCATGGTA AAGGTTTAGC AGTCCAGCTT
541 ATTGTAGGTA AAAACCAAGC ACTTGGAAT GAAGTTGCAC AGTACTCTAC ACAAATATG
601 GCAGCAAATA ACATTCATA TGTTATCTGG CAACAAAAGT TTTACTCAA TACAAATAGT
661 ATTTATGGAC CTGCTAATAC TTGGAATGCA ATGCCAGATC GTGGTGGCGT TACTGCCAAC
721 CATTATGACC ATGTTACCT ATCATTTAAC AAA

```

Figura 12 (SEC ID N°: 12)

```

1 AANEQVSTAP VKSITSEVPA AKEEVKPTQT SVSQSTTVSP ASVAAETPAP VAKVAPVRTV
61 AAPRVASVKV VTPKVTGAS PEHVSAPAVP VTTTSTATDS KLQATEVKS VPAQKAPTAT
121 PVAQPASTTN AVAAHPENAG LQPHVAAYKE KVASTYGVNE FSTYRAGDPG DHGKGLAVDF
181 IVGKNQALGN EVAQYSTQNM AANNISYVIW QQKFYSNTNS IYGPANTWNA MPDRGGVTAN
241 HYDHHVHSFN K

```

Figura 13 (SEC ID N°: 13)

```

1 GGTATGACAC CAGAAGCAGC AACAAACGATT GTTTCGCCAA TGAAGACATA TTCTTCTGCG
61 CCAGCTTTGA AATCAAAAAGA AGTATTAGCA CAAGAGCAAG CTGTTAGTCA AGCAGCAGCT
121 AATGAACAGG TATCAACAGC TCCTGTGAAG TCGATTACTT CAGAAGTTCC AGCAGCTAAA
181 GAGGAAGTTA AACCAACTCA GACGTCAGTC AGTCAGTCAA CAACAGTATC ACCAGCTTCT
241 GTTGCCGCTG AAACACCAGC TCCAGTAGCT AAAGTAGCAC CGGTAAGAAC TGTAGCAGCC
301 CCTAGAGTGG CAAGTGTTAA AGTAGTCACT CCTAAAGTAG AAACCTGGTGC ATCACCAGAG
361 CATGTATCAG CTCCAGCAGT TCCTGTGACT ACGACTTCAA CAGCTACAGA CAGTAAGTTA
421 CAAGCGACTG AAGTTAAGAG CGTTCGGTA GCACAAAAG CTCCAACAGC AACACCGGTA
481 GCACAACCAG CTTCAACAAC AAATGCAGTA GCTGCACATC CTGAAAATGC A

```

Figura 14 (SEC ID N°: 14)

```

1 GMTPEAATTI VSPMKTYSSA PALKSKEVLA QEQAVSQAAA NEQVSTAPVK SITSEVPAAK
61 EEVKPTQTSV SQSTTVSPAS VAAETPAPVA KVAPVRTVAA PRVASVKVVT PKVETGASPE
121 HVSAPAVPVT TTSTATDSKL QATEVKSVPV AOKAPTATPV AQPASTTNAV AAHPENA

```

Figura 15 (SEC ID N°: 15)

```

1 GCAGGGCTCC AACCTCATGT TGCAGCTTAT AAAGAAAAAG TAGCGTCAAC TTATGGAGTT
61 AATGAATTCA GTACATACCG TGCAGGTGAT CCAGGTGATC ATGGTAAAGG TTTAGCAGTC
121 GACTTTATTG TAGGTAAGAA CCAAGCACTT GGTAATGAAG TTGCACAGTA CTCTACACAA
181 AATATGGCAG CAAATAACAT TTCATATGTT ATCTGGCAAC AAAAGTTTTA CTCAAATACA
241 AATAGTATTT ATGGACCTGC TAATACTTGG AATGCAATGC CAGATCGTGG TGGCGTTACT
301 GCCAACCATT ATGACCATGT TCACGTATCA TTTAACAAA

```

Figura 16 (SEC ID N°: 16)

```

1 AGLQPHVAAY KEKVASTYGV NEFSTYRAGD PGDHGKGLAV DFIVGKNQAL GNEVAQYSTQ
61 NMAANNISYV IWQQKFYSNT NSIYGPANTW NAMPDRGGVT ANHYDHVHVS FNK

```

Figura 17 (SEC ID N°: 17)

```

1 GGTA AAAACC AAGCACTTGG TAATGAAGTT GCACAGTACT CTACACAAAA TATGGCAGCA
61 AATAACATTT CATATGTTAT CTGGCAACAA AAGTTTTACT CAAATACAAA TAGTATTTAT
121 GGACCTGCTA ATACTTGGAA TGCAATGCCA GATCGTGGTG GCCTTACTGC CAACCATTAT
181 GACCATGTTT ACGTATCATT TAACAAA

```

Figura 18 (SEC ID N°: 18)

```

1 GKNQALGNEV AQYSTQNMMA NNISYVIWQQ KFYSNTNSIY GPANTWNAMP DRGGVTANHY
61 DHVHVSFNK

```

Figura 19 (SEC ID N°: 19)

```

1 GTTATCTGGC AACAAAAGTT TTA CTCAAAT ACAAATAGTA TTTATGGACC TGCTAATACT
61 TGGAATGCAA TGCCAGATCG TGGTGGCGTT ACTGCCAACC APTATGACCA TGTTACAGTA
121 TCATTTAACA AA

```

Figura 20 (SEC ID N°: 20)

```

1 VIWQQKFYSN TNSIYGPANT WNAMPDRGGV TANHYDHVHV SFNK

```