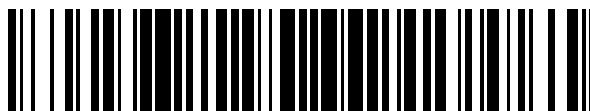


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 893**

51 Int. Cl.:
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01978039 .4**
96 Fecha de presentación: **15.10.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1325133**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2003**

54 Título: **Antígenos BVH-A2 y BVH-3 de streptococcus del grupo B**

30 Prioridad:
13.10.2000 US 239919 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.06.2012

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

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

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 382 893 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

Antígenos BVH-A2 y BVH-A3 de *Streptococcus* del grupo B

Campo de la invención

5 La presente invención está relacionada con polipéptidos de *Streptococcus* del grupo B (GBS) (*S. agalactiae*) y fragmentos de ADN correspondientes que pueden ser útiles para prevenir, diagnosticar y/o tratar infecciones por GBS en individuos tales como seres humanos.

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 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 infecciones en neonatos, futuras madres, algunas adultas no embarazadas, además de mastitis en rebaños lecheros. 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.

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 del tracto urinario leve a septicemia y meningitis potencialmente mortales, que también incluyen osteomielitis, endocarditis, amnionitis, endometritis, infecciones por heridas (postcesárea y postepisiotomía), celulitis, fascitis.

30 Entre 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 cáncer, o personas ancianas.

Las infecciones por GBS también pueden producirse en animales y producen mastitis en rebaños lecheros.

35 Para encontrar una vacuna que protegerá a los huéspedes de infección por GBS, los investigadores han vuelto a los antígenos específicos para tipo. Desafortunadamente, estos polisacáridos han demostrado ser escasamente inmunogénicos en huéspedes y están limitados al serotipo particular del que se origina el polisacárido. Además, los polisacáridos capsulares provocan una respuesta independiente de linfocitos T, es decir, sin producción de IgG. Consecuentemente, los antígenos de polisacáridos capsulares son inadecuados como componente de vacuna para la protección contra infección por GBS.

40 Otros se han centrado en el antígeno beta de la proteína C que demostró propiedades inmunogénicas en modelos de ratón y modelos de conejo. Se encontró que esta proteína era inadecuada como vacuna humana debido a su propiedad no deseable de interactuar 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.

45 Por tanto, permanece la necesidad sin satisfacer de polipéptidos de GBS que pueden ser útiles para prevenir, diagnosticar y/o tratar infecciones por GBS en individuos tales como seres humanos.

50 El documento WO 99/42588 desvela antígenos de *Streptococcus* del grupo B que son antigénicos y útiles para componentes de vacuna para la profilaxis o terapia de infección por *Streptococcus* en animales. También se desvelan procedimientos de producción de antígenos de proteína, además de ensayos de diagnóstico para detectar infección bacteriana por *Streptococcus*.

Resumen de la invención

Según un aspecto, la presente invención proporciona 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°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos del mismo.

- 5 Según un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos de los mismos.

En otros aspectos se proporcionan polipéptidos codificados por polinucleótidos de la invención, composiciones farmacéuticas, 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 de producción de polipéptidos que comprenden cultivar dichas células huésped en condiciones adecuadas para la expresión.

10

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa la secuencia de ADN del gen BVH-A2 de la cepa NCS954 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo III; SEC ID N°: 1.

- 15 La Figura 2 representa la secuencia de ADN del gen BVH-A2 de la cepa NCS954 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo III sin la región que codifica su péptido conductor; SEC ID N°: 2.

La Figura 3 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de BVH-A2 de la cepa NCS954 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo III; SEC ID N°: 3.

- 20 La Figura 4 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de BVH-A2 de la cepa NCS954 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo III sin el péptido conductor de 37 residuos de aminoácidos; SEC ID N°: 4.

La Figura 5 representa la secuencia de ADN del gen BVH-A3 de la cepa NCS954 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo III; SEC ID N°: 5.

- 25 La Figura 6 representa la secuencia de ADN del gen BVH-A3 de la cepa NCS954 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo III sin la región que codifica el péptido conductor; SEC ID N°: 6.

La Figura 7 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de BVH-A3 de la cepa NCS954 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo III; SEC ID N°: 7.

- 30 La Figura 8 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido de BVH-A3 de la cepa NCS954 de *Streptococcus* del grupo B de serotipo III sin el péptido conductor de 28 residuos de aminoácidos; SEC ID N°: 8.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona polinucleótidos purificados y aislados que codifican polipéptidos de *Streptococcus* del grupo B que pueden usarse para prevenir, tratar y/o diagnosticar infección estreptocócica. La presente invención proporciona cuatro polinucleótidos preferidos separados, cada uno definido individualmente y por separado por una de SEC ID N° 1, 2, 5 y 6. En la presente invención se proporcionan adicionalmente cuatro polipéptidos separados, cada uno definido individualmente y por separado por una de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8. Aquellos expertos en la materia apreciarán que la invención incluye polinucleótidos que codifican análogos tales como mutantes, variantes, homólogos y derivados de tales polipéptidos, como se describen en este 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 invención incluye los polipéptidos y anticuerpos mono-específicos correspondientes que se unen específicamente a tales polipéptidos.

35

40

Según un aspecto, la presente invención proporciona 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°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos del mismo.

- 45 Según un aspecto, la presente invención proporciona 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°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos del mismo.

Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 85% de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos del mismo.

50

- Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 90% de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos del mismo.
- 5 Según un aspecto, la presente invención proporciona 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°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos del mismo.
- Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos del mismo.
- 10 Según un aspecto, la presente invención se refiere a polinucleótidos que codifica una porción que lleva epítope de un polipéptido que tiene una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos del mismo.
- Según un aspecto, la presente invención se refiere a porciones que llevan epítopes de un polipéptido que tiene una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos del mismo.
- Según un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que comprende las secuencias de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos de los mismos.
- 15 Según un aspecto, la presente invención proporciona 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°: 3, 4, 7 y 8.
- Según un aspecto, la presente invención proporciona 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°: 3, 4, 7 y 8.
- 20 Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 85% de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.
- Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene al menos el 90% de identidad con un segundo polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.
- 25 Según un aspecto, la presente invención proporciona 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°: 3, 4, 7 y 8.
- Según un aspecto, la presente invención proporciona 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°: 3, 4, 7 y 8.
- 30 Según un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.
- Según un aspecto, la presente invención se refiere a polinucleótidos que codifican una porción que lleva epítope de un polipéptido que tiene una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.
- Según un aspecto, la presente invención se refiere a porciones que llevan epítopes de un polipéptido que tiene una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.
- 35 En otra realización, la presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican un polipéptido que puede producir anticuerpos que tienen especificidad de unión por un polipéptido que tiene una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos de los mismos.
- En otra realización, la presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican un polipéptido que puede producir anticuerpos que tienen especificidad de unión por un polipéptido que tiene una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.
- 40 El porcentaje de homología se define como la suma del porcentaje de identidad más el porcentaje de similitud o conservación del tipo de aminoácido.
- 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 o similitud (identidad más conservación del tipo de aminoácido) 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.
- 45
- 50 En otra realización, los polipéptidos según la presente invención son antigénicos.

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 individuo.

5 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 han definido anteriormente.

En otra realización, la presente invención también se refiere a polipéptidos que pueden producir anticuerpos que tienen especificidad de unión por un polipéptido que tiene una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos de los mismos.

10 En otra realización, la presente invención también se refiere a polipéptidos que pueden producir anticuerpos que tienen especificidad de unión por un polipéptido que tiene una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.

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 que incluye naturalmente el péptido seleccionado. La unión específica puede medirse usando un ensayo de ELISA en el que el polipéptido seleccionado se usa como antígeno.

15 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.

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

25 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 este documento. La presente divulgación proporciona además fragmentos que tienen al menos 10 residuos de 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.

30 El experto apreciará que “fragmentos”, “análogos” o “derivados” 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, los polipéptidos que incluyen una o más adiciones, deleciones, sustituciones o similares están englobados por la presente invención.

35 Como se usa en este documento, “análogos” de los polipéptidos de la invención incluye aquellos polipéptidos en los que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado (preferentemente conservado) y que puede ser natural o no natural. En una realización, los 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 otra realización, los polipéptidos tendrán más del 80% 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.

40 En una realización, los derivados y análogos de polipéptidos de la invención tendrán aproximadamente el 70% de homología con aquellas secuencias ilustradas en las figuras o fragmentos de los mismos. En otra realización, los derivados y análogos de polipéptidos tendrán más del 80% de homología. En otra realización, los derivados y análogos de polipéptidos tendrán más del 90% de homología. En otra realización, los derivados y análogos de polipéptidos tendrán más del 95% de homología. En otra realización, los derivados y análogos de polipéptidos tendrán más del 99% de homología. En otra realización, los derivados y análogos de derivados y 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.

45 Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen al menos el 70% de identidad con un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos de los mismos.

50 Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen al menos el 80% de identidad con un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos de

los mismos.

Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen al menos el 85% de identidad con un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos de los mismos.

- 5 Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen al menos el 90% de identidad con un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos de los mismos.

10 Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen al menos el 95% de identidad con un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos de los mismos.

Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que comprenden una secuencia elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos de los mismos.

Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos caracterizados por una secuencia elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos de los mismos.

- 15 Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen al menos el 70% de identidad con un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.

Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen al menos el 80% de identidad con un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.

20 Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen al menos el 85% de identidad con un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.

Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen al menos el 90% de identidad con un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.

Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen al menos el 95% de identidad con un segundo polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.

- 25 Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos que comprenden una secuencia elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.

Según otro aspecto, la invención proporciona polipéptidos caracterizados por una secuencia elegida de: SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.

30 Estas sustituciones son aquellas que tienen una influencia mínima sobre la estructura secundaria y 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:

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

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

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

- 45 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.

Por tanto, lo que es importante para análogos, derivados y fragmentos es que posean al menos un grado de antigenicidad/inmunogénico de los polipéptidos de la invención de los que se derivan.

50

También están incluidos polipéptidos que se han fusionado a otros compuestos que alteran las propiedades biológicas o farmacológicas del polipéptido, 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.

5 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 GBS.

10 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.

15 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 multicistrónicos 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.

20 En otra realización, la presente invención también se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden dos o más polipéptidos que tienen una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 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 invención también se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden dos o más polipéptidos que tienen una secuencia elegida de SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8, siempre que los polipéptidos estén unidos de manera que formen un polipéptido quimérico.

25 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.

30 En una realización particular, los fragmentos de polipéptidos o análogos de la invención 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 cultivo de GBS y posteriormente secuenciarse para determinar el residuo inicial de la proteína madura y, por tanto, la secuencia del polipéptido maduro.

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

45 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 poliomiéлитis 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.

50 Según otro aspecto se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más polipéptidos de GBS de la invención en una mezcla con un diluyente o adyuvante de vehículo farmacéuticamente aceptable. Adyuvantes adecuados incluyen (1) formulaciones de emulsión de aceite en agua tales como MF59TM, SAFTM, RibitTM; (2) adyuvante completo o incompleto de Freund; (3) sales, es decir, AlK(SO₄)₂, AlNa(SO₄)₂, AlNH₄(SO₄)₂, Al(OH)₃, AlPO₄, sílice, caolín; (4) derivados de saponina tales como StimulonTM 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. 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) pag.2-11, 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.
- 5 Adyuvantes preferidos incluyen QuilA™, QS21™, Alhydrogel™ y Adjuphos™.
- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse parenteralmente por inyección, infusión rápida, absorción nasofaríngea, dermoabsorción, o bucal u oral.
- Las composiciones farmacéuticas de la invención se usan para el tratamiento o la profilaxis de infección estreptocócica y/o enfermedades y síntomas mediados por infección estreptocócica, en particular *Streptococcus* del grupo A (*S. pyogenes*), *Streptococcus* del grupo B (GBS o *S. agalactiae*), *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. nocardia*, además de *Staphylococcus aureus*. Información general sobre *Streptococcus*, y más particularmente GBS, está disponible en *Manual of Clinical Microbiology* por P. R. Murray y col. (1995, 6ª edición, ASM Press, Washington, D.C.).
- 10 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención se usan para el tratamiento o la profilaxis de infección por GBS y/o enfermedades y síntomas mediados por infección por GBS.
- 15 En una realización particular, las composiciones farmacéuticas se administran a aquellos individuos en riesgo de infección por GBS tales como mujeres embarazadas para infección urinaria leve a septicemia y meningitis potencialmente mortales, que también incluyen osteomielitis, endocarditis, amnionitis, endometritis, infecciones por heridas (postcesárea y postepisiotomía), celulitis, fascitis.
- 20 En una realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran a aquellos individuos en riesgo de infección por GBS tales como neonatos y lactantes para septicemia, meningitis, neumonía, celulitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis, epiglotis.
- En una realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran a aquellos individuos en riesgo de infección por GBS tales como adultas no embarazadas para 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 individuos debilitados tales como personas con una enfermedad crónica tal como diabetes mellitus y cáncer, o personas mayores.
- 25 En una realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran a aquellos individuos en riesgo de infección por GBS tal como ganado vacuno para el tratamiento de mastitis en ganado vacuno.
- 30 En otro aspecto, la invención proporciona el uso de la composición farmacéutica de la invención para el tratamiento profiláctico o terapéutico de infección bacteriana por GBS en un individuo susceptible a infección por GBS que comprende administrar a dicho individuo una cantidad terapéutica o profiláctica de una composición de la invención.
- 35 Según otro aspecto, los polipéptidos de GBS de la invención pueden usarse en un kit que comprende los polipéptidos de la invención para la detección de diagnóstico de infección por GBS.
- Como se usa en la presente solicitud, el término "individuo" incluye mamíferos. En otra realización, los mamíferos son seres humanos. En otra realización, los mamíferos son seres no humanos, tales como rebaños.
- En una realización particular, las composiciones farmacéuticas de la invención se administran a aquellos individuos en riesgo de infección por GBS tal como neonatos.
- 40 Las composiciones farmacéuticas de la invención están preferentemente en forma de dosificación unitaria de aproximadamente 0,001 a 100 µg/kg (antígeno/peso corporal) y más preferentemente de 0,01 a 10 µg/kg y lo más preferentemente de 0,1 a 1 µg/kg, 1 a 3 veces, con un intervalo de aproximadamente 1 a 6 semanas entre inmunizaciones.
- 45 Las composiciones farmacéuticas están 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.
- En una realización, los polinucleótidos son aquellos ilustrados en SEC ID N°: 1, 2, 5 y 6 que pueden incluir los marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican los polipéptidos de la invención.
- 50 En una realización, los polinucleótidos son aquellos ilustrados en SEC ID N°: 1, 2, 5 y 6 que codifican los polipéptidos de la invención.
- 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 en descritos anteriormente este documento (o la secuencia de complemento de

los mismos) que tienen al menos el 50% de identidad entre secuencias. En una realización, al menos el 70% de identidad entre secuencias. En una realización, al menos el 75% de identidad entre secuencias. En una realización, al menos el 80% de identidad entre secuencias. En una realización, al menos el 85% de identidad entre secuencias. En una realización, al menos el 90% de identidad entre secuencias. En otra realización, los polinucleótidos son hibridables bajo condiciones rigurosas, es decir, que tienen al menos el 95% de identidad. En otra realización, más del 97% identidad.

Condiciones rigurosas adecuadas para la hibridación pueden ser fácilmente determinadas por 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.).

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

- (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido, como con
- (b) el complemento de un polinucleótido que codifica un polipéptido; en los que dicho polipéptido comprende SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8, o fragmentos o análogos del mismo.

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

- (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido, como con
- (b) el complemento de un polinucleótido que codifica un polipéptido; en los que dicho polipéptido comprende al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido que comprende SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8 o fragmentos o análogos del mismo.

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

- (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido, como con
- (b) el complemento de un polinucleótido que codifica un polipéptido; en los que dicho polipéptido comprende SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.

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

- (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido, como con
- (b) el complemento de un polinucleótido que codifica un polipéptido;

en los que dicho polipéptido comprende al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido que comprende SEC ID N°: 3, 4, 7 y 8.

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.

En otro aspecto, los polinucleótidos que codifican polipéptidos de la invención, o fragmentos o análogos 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.

Según otro aspecto se proporciona un proceso o procedimiento de fabricación 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).

Procedimientos generales para la obtención y evaluación de polinucleótidos y polipéptidos se describen en las siguientes referencias: 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.; *PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering*, (1997) editado por White B.A., Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, 490 páginas; *Protein Purification, Principles and Practices*, (1993) Scopes R.K., Springer-Verlag, 5 N.Y., 3ª edición, 380 páginas; *Current Protocols in Immunology*, (1999) editado por Coligan J.E. y col., John Wiley & Sons Inc., N.Y.

Para la producción recombinante, 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 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 control de la expresión que sean apropiados para un huésped dado y vector según principios de biología molecular establecidos (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 and Sons, Inc. N.Y.). 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 marcadores de selección, es decir, gen de resistencia a antibiótico. Vectores bacterianos adecuados incluyen pET, pQE70, pQE60, pQE-9, pD10, Phagescript, PSIX174, pBluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 y los vectores eucariotas pBlueBacIII, pWLNEO, 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 nidulans*), de levadura (es decir, *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.

El polipéptido puede expresarse con o sin una secuencia conductora o de secreción. En el primer caso, el conductor puede eliminarse usando procesamiento postraducciona (véanse los documento 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 GBS de la invención pueden usarse en una prueba de diagnóstico para infección por GBS, en particular infección por GBS. Varios procedimientos de diagnóstico son posibles, por ejemplo, para la detección del organismo de GBS en una muestra biológica puede seguirse el siguiente procedimiento:

- a. obtener una muestra biológica de un individuo;
- b. incubar un anticuerpo o fragmento del mismo reactivo con un polipéptido de GBS de la invención con la muestra biológica para formar una mezcla, y
- c. detectar anticuerpo específicamente unido o fragmento unido en la mezcla que indica la presencia de GBS.

Alternativamente, un procedimiento para la detección de anticuerpo específico para un antígeno de GBS en una muestra biológica que contiene o de la que se sospecha que contiene dicho anticuerpo puede realizarse del siguiente modo:

- a. obtener una muestra biológica de un individuo;
- b. incubar uno o más polipéptidos de GBS de la invención o fragmentos de los mismos con la muestra biológica para formar una mezcla; y
- c. detectar antígeno específicamente unido o fragmento unido en la mezcla que indica la presencia de anticuerpo específico para GBS.

Un experto en la materia reconocerá que esta prueba de diagnóstico puede tomar varias formas, que incluyen una prueba inmunológica tal como un ensayo inmunoanálisis 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.

Los polinucleótidos que codifican polipéptidos de la invención también pueden usarse para diseñar sondas de ADN para su uso en detectar la presencia de GBS 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 individuo;
- 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 GBS.

Las sondas de ADN de esta invención también pueden usarse para detectar GBS en circulación (es decir, ácidos nucleicos de GBS) en una muestra, por ejemplo, usando una reacción en cadena de la polimerasa como procedimiento de diagnóstico de infecciones por GBS. 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 para esta aplicación es un oligómero que tiene una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 6 nucleótidos contiguos de los polipéptidos de GBS de la invención.

Otro procedimiento de diagnóstico para la detección de GBS en un individuo 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 individuo; y
- c. detectar anticuerpo marcado específicamente unido o fragmento marcado en el individuo que indica la presencia de GBS.

Otro aspecto de la invención es el uso de los polipéptidos de GBS de la invención como inmunógenos para la producción de anticuerpos específicos para el diagnóstico y en particular el tratamiento de infección por GBS. Anticuerpos adecuados pueden determinarse usando procedimientos de cribado apropiados, por ejemplo, midiendo la capacidad de un anticuerpo particular para proteger pasivamente contra infección por GBS en un modelo de prueba. Un ejemplo de un modelo animal es el modelo de ratón descrito en el ejemplo en este 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 GBS, pero es preferentemente específico para uno.

Otro aspecto desvelado en este documento es el uso de una composición farmacéutica de la invención para el tratamiento profiláctico o terapéutico de infección por GBS que comprende administrar a dicho individuo una cantidad profiláctica o terapéutica de la composición.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la identificación de genes BVH-A2 y BVH-A3 de GBS.

Se aisló ADN cromosómico de diferentes cepas de GBS como se ha descrito previamente (Jayarao BM y col. 1991. J. Clin. Microbiol. 29:2774-2778). Se construyó una biblioteca genómica λ ZAPExpress usando ADN cromosómico purificado de la cepa NCS954 de GBS del serotipo III y se cribó según las instrucciones del fabricante (Stratagene, La Jolla, CA) con un conjunto de sueros normales humanos. Brevemente, el ADN cromosómico purificado se digirió parcialmente con enzima de restricción *tsp509I*, y los fragmentos resultantes se sometieron a electroforesis sobre un 1% de gel de agarosa (Bio-Rad). Los fragmentos en el intervalo de 5 a 10 kb de tamaño se extrajeron del gel y se ligaron a los brazos de EcoRI del vector de λ ZAPExpress y el vector se encapsidó usando el extracto de encapsidación Gigapack II (Stratagene). Los fagos recombinantes se usaron para infectar XL1-Blue MRF' de *E. coli* [Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* (*F'* *proAB lacI^fZ Δ M15 Tn10 [Tet^R])*], que luego se sembró sobre agar LB. Las placas resultantes se levantaron sobre membranas de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfée, Canadá) preimpregnadas con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido 10 mM (IPTG: ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA). Las membranas se bloquearon usando solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 3% de leche desnatada y se incubaron secuencialmente con los sueros humanos reunidos, antisueros de cabra dirigidos contra inmunoglobulina humana marcada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) y sustrato. Se aislaron placas positivas, se purificaron dos veces y los plásmidos pBK-CMV (Stratagene) recombinantes se escindieron con el fago auxiliar ExAssist (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. Las inmunotransferencias usando vectores de fagémido que contenían los insertos clonados revelaron que los sueros humanos reunidos reaccionaron con una banda de proteína con un peso molecular aproximado de 65 kDa para el clon H31-29, mientras que reaccionó con dos bandas de proteína con un peso molecular aproximado entre 40-60 kDa para el clon F8. Estos clones se identificaron respectivamente como BVH-A2 y BVH-A3. La secuencia de los insertos se determinó usando el kit de secuenciación Taq Dye Deoxy Terminator Cycle con un secuenciador automatizado Applied Biosystems Inc. (Foster City, CA) modelo 373A según recomendaciones del fabricante.

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la clonación de genes BVH-A2 y BVH-A3 de GBS.

Las regiones codificantes de genes BVH-A2 (SEC ID N°: 1) y BVH-A3 (SEC ID N°: 5) estreptocócicos del grupo B se amplificaron respectivamente por PCR (ciclador térmico de ADN GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer, San Jose, CA) a partir del clon H31-29 de fagémido recombinante purificado y ADN genómico de la cepa NCS954 estreptocócica del grupo B de serotipo III usando cebadores de oligonucleótidos que contenían extensiones de bases para la adición de sitios de restricción *NdeI* (CATATG) y *XhoI* (CTCGAG). Los cebadores de oligonucleótidos (Tabla 1) DMAR172 (SEC ID N°: 9) y DMAR173 (SEC ID N°: 10) se usaron para amplificar el gen BVH-A2, mientras que DMAR204 (SEC ID N°: 15) y DMAR205 (SEC ID N°: 16) se usaron para amplificar el gen BVH-A3. 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 (Chatsworth, CA) y se digirieron con *NdeI* y *XhoI* (Pharmacia Canada Inc, Baie d'Urfé, Canadá). El vector pET-21b(+) (Novagen, Madison, WI) se digirió con *NdeI* y *XhoI* y se purificó en gel de agarosa usando un kit de extracción en gel QIAquick de QIAGEN (Chatsworth, CA). Los productos de PCR *NdeI-XhoI* se ligaron al vector de expresión *NdeI-XhoI* pET-21b(+). Los productos ligados se transformaron en la cepa DH5 α de *E. coli* [ϕ 80d*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *endA1 recA1 hsdR17* (*r_k-m_k*+) *deoR thi-1 supE44 λ gyrA96 relA1*] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) según el procedimiento de Simanis (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed), pág. 109-135). Los plásmidos de pET-21b(+) recombinantes (rpET21b(+)) que contenían los genes BVH-A2 o BVH-A3 se purificaron usando un kit de plásmidos QIAGEN (Chatsworth, CA) y los insertos de ADN se secuenciaron (kit de secuenciación Taq Dye Deoxy Terminator Cycle, ABI, Foster City, CA).

Se determinó que el marco de lectura abierto (ORF) que codifica el gen BVH-A2 (SEC ID N°: 1) contiene 1626 pb y codifica un polipéptido de 541 residuos de aminoácidos con un pl predicho de 8,99 y una masa molecular predicha de 59730,66 Da. El análisis de la secuencia de residuos de aminoácidos predicha (SEC ID N°: 3) usando el software SpScan (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) sugirió la existencia de un péptido señal de 37 residuos de aminoácidos (MRGSLSTKQSYSLRKYKFGGLASVILGFSFIMVTSPVFA), que termina con un sitio de escisión situado entre un residuo de alanina y de ácido aspártico. El análisis de este ORF no reveló la presencia de estructuras repetitivas, o motivo de unión a IgA (MLKKIE), pero se identificó un motivo de anclaje a la pared celular putativa (LPKTG) próximo al extremo C entre los residuos de aminoácidos 479 y 483. La comparación de la secuencia de aminoácidos de BVH-A2 (SEC ID N° 3) con las secuencias compiladas en las bases de datos disponibles reveló el 18% identidad con una proteína exportada transmembrana de 40 kDa hipotética de *Streptococcus mutans* que se localizó en la dirección 5' del gen *sr* que codifica la proteína SR implicada en las interacciones de *S. mutans* con glicoproteínas salivales (número de acceso GeneBank: c60328: Ogier y col. 1991. Infection and Immunity, 59:1620-1626).

Tabla 1. Cebadores de oligonucleótidos usados para ampliaciones por PCR de genes BVH-A2 y BVH-A3 de GBS

Genes	ID de cebadores de oligonucleótidos	Secuencias
BVH-A2	DMAR172 (SEC ID N° 9)	5'-CTTTGGGGAACATATGAGGGGATCTC-3'
BVH-A2	DMAR173 (SEC ID N° 10)	5'-CTAAAAAGATTTACTCGAGAATTTCAATATAGCG-3'
BVH-A2	DMAR373 (SEC ID N° 11)	5'-ATGAGGGGATCTCTCAGTACTAAGCAATCTT-3'
BVH-A2	DMAR374 (SEC ID N° 12)	5'-TTAAATTTCAATATAGCGACGAATACCGGA-3'
BVH-A2	DMAR464 (SEC ID N° 13)	5'-CATAGGATCCGGATCAAACACTACATCGGTTCAAG-3'
BVH-A2	DMAR465 (SEC ID N° 14)	5'-CCGGGTCGACTTAAATTTCAATATAGCGACG-3'
BVH-A3	DMAR204 (SEC ID N° 15)	5' -CACAGGAGAACATATGAAGATTAATAAATAATTATTAGT GGCTTTGCC - 3'
BVH-A3	DMAR205 (SEC ID N° 16)	5'-CTTTCTCGAGTGCACCTTGATGGCGATCAGC-3'
BVH-A3	DMAR466 (SEC ID N° 17)	5' -CATAGGATCCTGATGACACCACAGTGAGTATCACTA TATC - 3'
BVH-A3	DMAR467 (SEC ID N° 18)	5'-CATAGTCGACTTATGCACCTTGATGGCGATCAG-3'

Se determinó que el marco de lectura abierto (ORF) que codifica el gen BVH-A3 (SEC ID N°: 5) contenía 1590 pb y codificaba un polipéptido de 529 residuos de aminoácidos con un pl predicho de 6,14 y una masa molecular predicha de 59019,48 Da. El análisis de la secuencia de residuos de aminoácidos predicha (SEC ID N°: 7) usando el software SpScan (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) sugirió la existencia de un péptido señal de 28 residuos de aminoácidos (MKIKKIISGFAAALISSLSTINYEVKA), que termina con un sitio de escisión situado entre un residuo de alanina y de ácido aspártico. El análisis de este ORF no reveló la presencia de

estructuras repetitivas, motivo de anclaje a la pared celular (LPXTG) o motivo de unión a IgA (MLKKIE). La comparación de la secuencia de aminoácidos de BVH-A3 (SEC ID N° 7) con las secuencias compiladas en las bases de datos disponibles no reveló ninguna homología significativa con secuencias disponibles en los bancos de datos.

Ejemplo 3

5 Este ejemplo describe la amplificación por PCR de genes BVH-A2 y BVH-A3 de GBS de otras cepas de GBS

Para confirmar la presencia por amplificación por PCR de genes BVH-A2 (SEC ID N°: 1) y BVH-A3 (SEC ID N°: 5) se usaron las 11 siguientes cepas de GBS serológicamente distintas: C388/90 (serotipo Ia/c), ATCC12401 (serotipo Ib), ATCC27591 (serotipo Ic), NCS246 (serotipo II/R), NCS954 (serotipo III), NCS97SR331 (serotipo IV), NCS535 (serotipo V), NCS9B42 (serotipo VI), NCS7271 (serotipo VII), NCS970886 (serotipo VIII), ATCC27956 (cepa aislada bovina). Estos cepas se obtuvieron de la Colección americana de cultivos tipo (Rockville, MD, EE.UU.) y el Centro nacional para *Streptococcus*, Laboratorio provincial de salud pública de Alberta del Norte (Edmonton, Canadá). En estos experimentos se usó la cepa XL1-Blue MRF' de *E. coli* como control negativo. Se aisló ADN cromosómico de cada cepa estreptocócica del grupo B como se ha descrito previamente (Jayarao BM y col. 1991. J. Clin. Microbiol. 29:2774-2778). Los genes BVH-A2 (SEC ID N°: 1) y BVH-A3 (SEC ID N°: 5) se amplificaron por PCR (ciclador térmico de ADN GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer, San Jose, CA) a partir del ADN genómico purificado de las 11 cepas de GBS y la cepa de *E. coli* de control usando los oligonucleótidos presentados en la Tabla 1. Los cebadores de oligonucleótidos DMAR373 (SEC ID N°: 11) y DMAR374 (SEC ID N°: 12) se usaron para amplificar el gen BVH-A2 (SEC ID N°: 1), mientras que DMAR204 (SEC ID N°: 15) y DMAR205 (SEC ID N°: 16) se usaron para amplificar el gen BVH-A3 (SEC ID N°: 5). Se realizó PCR con 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 55°C y 2 min a 72°C y un periodo de extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR se fraccionaron a tamaño en 1% de geles de agarosa y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Los resultados de estas amplificaciones por PCR se presentan en la Tabla 2. El análisis de los productos de amplificación revelaron que tanto los genes BVH-A2 (SEC ID N°: 1) como BVH-A3 (SEC ID N°: 5) estaban presentes en el genoma de las 11 cepas de GBS probadas. No se detectó tal producto cuando el ADN de *E. coli* de control se sometió a idénticas amplificaciones por PCR con ambos conjuntos de cebadores de oligonucleótidos.

Tabla 2. Identificación de genes BVH-A2 y BVH-A3 por amplificación por PCR

Identificación de cepas	Identificación por amplificación por PCR de	
	<u>BVH-A2</u>	<u>BVH-A3</u>
Cepas aisladas de <u>GBS</u>		
C388/90 (serotipo Ia/c)	+	+
ATCC12401 (serotipo Ib)	+	+
ATCC27591 (serotipo Ic)	+	+
NCS246 (serotipo II/R)	+	+
NCS954 (serotipo III)	+	+
NCS97SR331 (serotipo IV)	+	+
NCS535 (serotipo V)	+	+
NCS9842 (serotipo VI)	+	+
NCS7271 (serotipo VII)	+	+
NCS970886 (serotipo VIII)	+	+
ATCC27956 (cepa aislada bovina)	+	+
Cepa XL1 Blue MRF' de control de <i>E. coli</i>	-	-

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra la clonación de genes BVH-A2 y BVH-A3 de GBS en el plásmido pCMV-GH del CMV.

30 La región codificante de ADN de los polipéptidos de BHV-A2 (SEC ID N°: 4) y BVH-A3 (SEC ID N°: 8) estreptocócicos del grupo B se insertaron en fase en la dirección 3' de un gen de hormona de crecimiento humana (hGH) que estaba bajo el control de la transcripción del promotor del citomegalovirus (CMV) en el vector de plásmido pCMV-GH (Tang y col., Nature, 1992, 356:152). El promotor del CMV es plásmido no funcional en células de *E. coli*,

pero es activo tras la administración del plásmido a células eucariotas. El vector también incorporó el gen de resistencia a ampicilina.

Las regiones codificantes de los genes BVH-A2 (SEC ID N°: 2) y BVH-A3 (SEC ID N°: 6) sin sus regiones de péptido conductor se amplificaron por PCR (ciclador térmico de ADN GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer, San Jose, CA) a partir de ADN genómico de la cepa NCS954 de GBS del serotipo III usando cebadores de oligonucleótidos que contenían extensiones de bases para la adición de sitios de restricción *Bam*HI (GGATCC) y *Sal*I (GTCGAC). Los cebadores de oligonucleótidos DMAR464 (SEC ID N°: 13) y DMAR465 (SEC ID N°: 14) se usaron para amplificar el gen BVH-A2 (SEC ID N°: 2), mientras que DMAR466 (SEC ID N°: 17) y DMAR467 (SEC ID N°: 18) se usaron para amplificar el gen BVH-A3 (SEC ID N°: 6). Los productos de PCR se purificaron en gel de agarosa usando un kit de extracción en gel QIAquick de QIAGEN (Chatsworth, CA), se digirieron con enzimas de restricción (Pharmacia Canada Inc, Baie d'Urfe, Canadá). El vector pCMV-GH (Laboratorio del Dr. Stephen A. Johnston, Departamento de Bioquímica, Universidad de Texas, Dallas, Texas) se digirió con *Bam*HI y *Sal*I y se purificó en gel de agarosa usando el kit de extracción en gel QIAquick de QIAGEN (Chatsworth, CA). Los fragmentos de ADN de *Bam*HI-*Sal*I se ligaron al vector de pCMV-GH de *Bam*HI-*Sal*I para crear los polipéptidos de fusión hGH-BVH-A2 y hGH-BVH-A3 bajo el control del promotor del CMV. Los productos ligados se transformaron en la cepa DH5 α de *E. coli* [ϕ 80d*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *endA1 recA1 hsdR17* (*r_k-m_k*+) *deoR thi-1 supE44 λ gyrA96 relA1*] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) según el procedimiento de Simanis (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed), pág. 109-135). Los plásmidos de pCMV recombinantes se purificaron usando un kit de plásmidos QIAGEN (Chatsworth, CA) y las secuencias de nucleótidos de los insertos de ADN se verificaron por secuenciación de ADN.

20 Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra el uso de ADN para provocar una respuesta inmunitaria a antígenos de polipéptidos de BVH-A2 y BVH-A3 de GBS.

Grupos de 8 ratones BALB/c hembra (Charles River, St-Constant, Québec, Canadá) se inmunizaron por inyección intramuscular tres veces con 100 μ l a intervalos de dos o tres semanas con 50 μ g de pCMV-GH recombinante que codifica los genes BVH-A2 (SEC ID N°: 2) o BVH-A3 (SEC ID N°: 6) en presencia de 50 μ g del plásmido pCMV-GH-GM-CSF que expresa el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) (Laboratorio del Dr. Stephen A. Johnston, Departamento de Bioquímica, Universidad de Texas, Dallas, Texas). Como control, grupos de ratones se inyectaron con 50 μ g de pCMV-GH en presencia de 50 μ g de pCMV-GH-GM-CSF. Las muestras de sangre se recogieron tanto del seno orbital antes de cada inmunización como siete días tras la tercera inyección y las respuestas de anticuerpos en suero se determinaron por ELISA usando polipéptidos recombinantes tanto de BVH-A2-His•Tag como de BVH-A3-His•Tag purificados como antígenos de recubrimiento.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la producción y purificación de polipéptidos de BVH-A2 y BVH-A3 de GBS recombinantes.

Los plásmidos pET-21b(+) recombinantes con genes BVH-A2 o BVH-A3 respectivamente correspondientes a SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 5 se usaron para transformar por electroporación (aparato Gene Pulser II, BIO-RAD Labs, Mississauga, Canadá) la cepa BL21(DE3) de *E. coli* (F ompT hsdS_B (*r_{BM}*) gal dcm (DE3)) (Novagen, Madison, WI). En esta cepa de *E. coli*, el T7 promotor que controla la expresión del polipéptido recombinante es específicamente reconocido por la ARN polimerasa T7 (presente en el profago λ DE3) cuyo gen está bajo el control del promotor lac que es inducible por isopropil- β -d-tio-galactopiranosido (IPTG). Los transformantes BL21(DE3)/rpET 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, Canadá) por ml hasta que la A₆₀₀ alcanzó un valor de 0,6. Con el fin de inducir la producción de polipéptidos recombinantes de BVH-A2-His•Tag y BVH-A3-His•Tag de GBS, las células se incubaron durante 3 horas adicionales en presencia de IPTG a una concentración final de 1 mM. Las células inducidas a partir de un cultivo de 500 ml se sedimentaron por centrifugación y se congelaron a -70°C.

La purificación de los polipéptidos recombinantes a partir de la fracción citoplásmica soluble de BL21(DE3)/rpET21b inducido por IPTG (+) se hizo por cromatografía de afinidad basándose en las propiedades de la secuencia His•Tag (6 residuos de histidina consecutivos) para unirse a cationes divalentes (Ni²⁺) inmovilizados sobre la resina de quelación metálica His•Bind. Brevemente, las células sedimentadas obtenidas de un cultivo de 500 ml inducidas con IPTG se resuspendieron en tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 7,9) que contenía PMSF 1 mM, se sonicaron y se centrifugaron a 12.000 x g durante 20 min para eliminar los residuos. El sobrenadante se depositó sobre una columna de agarosa Ni-NTA (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canadá). Los polipéptidos recombinantes de BVH-A2-His•Tag y BVH-A3-His•Tag de GBS se eluyeron con imidazol 250 mM-NaCl 500 mM-Tris 20 mM a pH 7,9. La eliminación de la sal e imidazol de las muestras se hizo por diálisis contra PBS a 4°C. Las cantidades de polipéptidos recombinantes obtenidas de la fracción soluble de *E. coli* se estimó por MicroBCA (Pierce, Rockford, Illinois).

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra la accesibilidad a anticuerpos de los polipéptidos de BVH-A2 y BVH-A3 de GBS en la superficie de cepas de GBS.

5 Se cultivaron bacterias en caldo Todd Hewitt (TH) (Difco Laboratories, Detroit MI) con 0,5% de extracto de levadura (Difco Laboratories) y 0,5% de extracto de peptona (Merck, Darmstadt, Alemania) a 37°C en una atmósfera de 8% de CO₂ dando una DO_{490 nm} de 0,600 (~10⁸ UFC/ml). Luego se añadieron diluciones de anti-BVH-A2, anti-BVH-A3 o sueros de control y se dejó que se unieran a las células, que se incubaron durante 2 h a 4°C. Las muestras se lavaron 4 veces en tampón de bloqueo [solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía 2% de albúmina de suero bovino (BSA)], y luego se añadió 1 ml de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG + IgM de ratón conjugada con fluoresceína (FITC) diluido en tampón de bloqueo. Después de una incubación adicional de 60 min a temperatura ambiente, las muestras se lavaron 4 veces en tampón de bloqueo y se fijaron con 0,25% de formaldehído en tampón PBS durante 18-24 h a 4°C. Las células se lavaron 2 veces en tampón PBS y se resuspendieron en 500 µl 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.).

Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra la protección contra infección por GBS mortal inducida por inmunización pasiva de ratones con sueros hiperinmunes de conejo.

20 Conejos New Zealand (Charles River Laboratories, St-Constant, Canadá) se inyectaron subcutáneamente en múltiples sitios con 50 µg y 100 µg de polipéptidos de BVH-A2-His•Tag o BVH-A3-His•Tag que se produjeron y se purificaron como se ha descrito en el Ejemplo 6 y se adsorbieron sobre adyuvante Alhydrogel (Superfos Biosector a/s). Los conejos se inmunizaron tres veces a intervalos de tres semanas con los polipéptidos de BVH-A2-His•Tag o BVH-A3-His•Tag. Se recogieron muestras de sangre tres semanas después de la tercera inyección. Los anticuerpos presentes en el suero se purificaron mediante precipitación usando 40% de sulfato de amonio saturado. Los grupos de 10 ratones CD-1 hembra (Charles River) se inyectaron intravenosamente con 500 µl de suero purificado recogido de conejos inmunizados tanto con BVH-A2-His•Tag como con BVH-A3-His•Tag, o conejos inmunizados con una proteína recombinante de control sin relacionar. Dieciocho horas después, los ratones se expusieron a aproximadamente 8x10⁴ UFC de la cepa C388/90 de GBS (1a/c). Las muestras del inóculo de exposición a GBS se sembraron sobre placas de agar sangre para determinar las UFC y para verificar la dosis de exposición. Las muertes se registraron durante un periodo de 14 días.

Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra la protección de ratones contra infección por GBS mortal inducida por inmunización.

35 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 tanto BVH-A2-His•Tag como BVH-A3-His•Tag que se produjeron y se purificaron como se ha descrito en el Ejemplo 6 en presencia de 10 µg de adyuvante QuilA (Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canadá). Los ratones de control se inyectaron con adyuvante QuilA solo en PBS. Se recogieron muestras de sangre del seno orbital en el día 1, 22 y 43 antes de cada inmunización y siete días (día 50) tras la tercera inyección. Dos semanas después, los ratones se expusieron a aproximadamente 8x10⁴ UFC de la cepa C388/90 de GBS (1a/c). Las muestras del inóculo de exposición a GBS se sembraron sobre placas de agar sangre para determinar las UFC y para verificar la dosis de exposición. Las muertes se registraron durante un periodo de 14 días.

Lista de secuencias

45 <110> SHIRE BIOCHEM INC.
MARTIN, Denis
RIOUX, Stephane
BOYER, Martine
HAMEL, Josee
BRODEUR, Bernard R.

50 <120> ANTÍGENOS DE BVH-A2 y BVH-A3 DE GBS

<130> 12806-23PCT

55 <140> PCT/CA01/01465
<141> 15-10-2001

<150> US 60/239.919

ES 2 382 893 T3

<151> 13-10-2000

<160> 21

5 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 1626

<212> ADN

10 <213> *Streptococcus* del grupo B

<400> 1

```

atgaggggat ctctcagtac taagcaatct tactctctac gtaaataata atttgggttta      60
gcatcagtaa ttttagggtc attcataatg gtcacaagtc ctgtttttgc ggatcaaact      120
acatcgggttc aagttaataa tcagacaggc actagtggtg atgctaataa ttcttccaat      180
gagacaagtg cgtcaagtgt gattacttcc aataatgata gtggtcaagc gtctgataaa      240
gttgtaaata gtcaaaatac ggcaacaaag gacattacta ctcccttagt agagacaaag      300
ccaatgggtgg aaaaaacatt acctgaacaa ggaattatg tttatagcaa agaaaccgag      360
gtgaaaaata caccttcaaa atcagcccca gtagctttct atgcaaagaa aggtgataaa      420
gttttctatg accaagtatt taataaagat aatgtgaaat ggatttcata taagtctttt      480
ggtgggcgtac gtcgatacgc agctattgag tcactagatc catcaggagg ttcagagact      540
aaagcaccta ctctgtaac aaattcagga agcaataatc aagagaaaat agcaacgcaa      600
ggaaattata cattttcaca taaagtagaa gtaaaaaatg aegctaaggt agcgagtcca      660
actcaattta cattggacaa aggagacaga attttttacg accaaatact aactattgaa      720
ggaaatcagt ggttatctta taaatcattc aatgggtgtc gtcgttttgt tttgctaggt      780
aaagcatctt cagtagaaaa aactgaagat aaagaaaaag tgtctctca accacaagcc      840
cgtattacta aaactggtag actgactatt tctaacgaaa caactacagg ttttgatatt      900
ttaattacga atattaaaga tgataacggg atcgtgctg ttaaggtacc ggtttgact      960
gaacaaggag ggcaagatga tattaatgg tatacagctg taactactgg ggatggcaac     1020
tacaaagtag ctgtatcatt tgctgaccat aagaatgaga agggctctta taatattcat     1080
ttatactacc aagaagctag tgggacactt gtaggtgtaa caggaactaa agtgacagta     1140
gctggaacta attcttctca agaacctatt gaaaatgggt taccaaagac tgggtgtttat     1200
aatattatcg gaagtactga agtaaaaaat gaagctaaaa tatcaagtca gaccaattt     1260
actttagaaa aaggtagaaa aataaattat gatcaagtat tgacagcaga tggttaccag     1320
tggatttctt acaaacttta tagtggtgtt cgctgctata ttctgtgaa aaagctaact     1380
acaagtagtg aaaaagcгаа agatgaggcg actaaaccga ctagttatcc caacttacct     1440
aaaacaggta cctatacatt tactaaaact gtagatgtga aaagtcaacc taaagtatca     1500

```


ES 2 382 893 T3

agtcacgtgg aatttaattt tcaaaagggg gaaaaaatac attatgatca agtggttagta 1560
 gtagatgggc atcagtggtt tccatacaag agttattccg gtattcgctg ctatattgaa 1620
 atttaa 1626

<210> 2
 <211> 1515
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus* del grupo B

5

<400> 2
 gatcaaaacta catcggttca agttaataat cagacaggca ctagtgtgga tgctaataat 60
 tcttccaatg agacaagtgc gtcaagtgtg attacttcca ataatgatag tgttcaagcg 120
 tctgataaag ttgtaaatag tcaaaatacg gcaacaaagg acattactac tccttttagta 180
 gagacaaagc caatgggtgga aaaaacatta cctgaacaag ggaattatgt ttatagcaaa 240
 gaaaccgagg tgaaaaatac accttcaaaa tcagccccag tagctttcta tgcaaagaaa 300
 ggtgataaag ttttctatga ocaagtattt aataaagata atgtgaaatg gatttcatat 360
 aagtcttttg gtggcgtagc togatacgca gctattgagt cactagatcc atcaggaggt 420
 tcagagacta aagcacctac tcctgtaaca aattcaggaa gcaataatca agagaaaata 480
 gcaacgcaag gaaattatac attttccat aaagtagaag taaaaaatga agctaaggta 540
 gcgagtccaa ctcaatttac attggacaaa ggagacagaa ttttttacga ccaaatacta 600
 actattgaag gaaatcagtg gttatcttat aaatcattca atggtgttcg tcgttttggt 660
 ttgctaggta aagcatcttc agtagaaaaa actgaagata aagaaaaagt gtctcctcaa 720
 ccacaagccc gtattactaa aactggtaga ctgactattt ctaacgaaac aactacaggt 780
 tttgatattt taattacgaa tattaagat gataacggta tcgctgctgt taaggtagcg 840
 gtttggactg aacaaggagg gcaagatgat attaaatggg atacagctgt aactactggg 900
 gatggcaact acaaagtagc tgtatcattt gctgaccata agaatgagaa gggctcttat 960
 aatattcatt tatactacca agaagctagt gggacacttg taggtgtaac aggaactaaa 1020
 gtgacagtag ctggaactaa ttcttctcaa gaacctattg aaaatggttt accaaagact 1080

ES 2 382 893 T3

```

ggtgtttata atattatcgg aagtactgaa gtaaaaaatg aagctaaaat atcaagtcag 1140
accaattta ctttagaaaa aggtgacaaa ataaattatg atcaagtatt gacagcagat 1200
ggttaccagt ggatttctta caaatcttat agtgggtgtc gtcgctatat tcctgtgaaa 1260
aagctaacta caagtagtga aaaagcgaaa gatgaggcga ctaaaccgac tagttatccc 1320
aacttaccta aaacaggtac ctatacattt actaaaactg tagatgtgaa aagtcaacct 1380
aaagtatcaa gtccagtga atttaatttt caaaagggtg aaaaaataca ttatgatcaa 1440
gtgttagtag tagatggcca tcagtggatt tcatacaaga gttattccgg tattcgtcgc 1500
tatattgaaa tttaa 1515

```

<210> 3
 <211> 541
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus* del grupo B

5

<400> 3

```

Met Arg Gly Ser Leu Ser Thr Lys Gln Ser Tyr Ser Leu Arg Lys Tyr
  1           5           10           15
Lys Phe Gly Leu Ala Ser Val Ile Leu Gly Ser Phe Ile Met Val Thr
           20           25           30
Ser Pro Val Phe Ala Asp Gln Thr Thr Ser Val Gln Val Asn Asn Gln
           35           40           45
Thr Gly Thr Ser Val Asp Ala Asn Asn Ser Ser Asn Glu Thr Ser Ala
           50           55           60
Ser Ser Val Ile Thr Ser Asn Asn Asp Ser Val Gln Ala Ser Asp Lys
           65           70           75           80
Val Val Asn Ser Gln Asn Thr Ala Thr Lys Asp Ile Thr Thr Pro Leu
           85           90           95
Val Glu Thr Lys Pro Met Val Glu Lys Thr Leu Pro Glu Gln Gly Asn

```

ES 2 382 893 T3

100 105 110
 Tyr Val Tyr Ser Lys Glu Thr Glu Val Lys Asn Thr Pro Ser Lys Ser
 115 120 125
 Ala Pro Val Ala Phe Tyr Ala Lys Lys Gly Asp Lys Val Phe Tyr Asp
 130 135 140
 Gln Val Phe Asn Lys Asp Asn Val Lys Trp Ile Ser Tyr Lys Ser Phe
 145 150 155 160
 Gly Gly Val Arg Arg Tyr Ala Ala Ile Glu Ser Leu Asp Pro Ser Gly
 165 170 175
 Gly Ser Glu Thr Lys Ala Pro Thr Pro Val Thr Asn Ser Gly Ser Asn
 180 185 190
 Asn Gln Glu Lys Ile Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Thr Phe Ser His Lys
 195 200 205
 Val Glu Val Lys Asn Glu Ala Lys Val Ala Ser Pro Thr Gln Phe Thr
 210 215 220
 Leu Asp Lys Gly Asp Arg Ile Phe Tyr Asp Gln Ile Leu Thr Ile Glu
 225 230 235 240
 Gly Asn Gln Trp Leu Ser Tyr Lys Ser Phe Asn Gly Val Arg Arg Phe
 245 250 255
 Val Leu Leu Gly Lys Ala Ser Ser Val Glu Lys Thr Glu Asp Lys Glu
 260 265 270
 Lys Val Ser Pro Gln Pro Gln Ala Arg Ile Thr Lys Thr Gly Arg Leu
 275 280 285
 Thr Ile Ser Asn Glu Thr Thr Thr Gly Phe Asp Ile Leu Ile Thr Asn
 290 295 300
 Ile Lys Asp Asp Asn Gly Ile Ala Ala Val Lys Val Pro Val Trp Thr
 305 310 315 320
 Glu Gln Gly Gly Gln Asp Asp Ile Lys Trp Tyr Thr Ala Val Thr Thr

ES 2 382 893 T3

	325		330		335
Gly Asp Gly Asn Tyr Lys Val Ala Val Ser Phe Ala Asp His Lys Asn					
	340		345		350
Glu Lys Gly Leu Tyr Asn Ile His Leu Tyr Tyr Gln Glu Ala Ser Gly					
	355		360		365
Thr Leu Val Gly Val Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Ala Gly Thr Asn					
	370		375		380
Ser Ser Gln Glu Pro Ile Glu Asn Gly Leu Pro Lys Thr Gly Val Tyr					
385		390		395	400
Asn Ile Ile Gly Ser Thr Glu Val Lys Asn Glu Ala Lys Ile Ser Ser					
	405		410		415
Gln Thr Gln Phe Thr Leu Glu Lys Gly Asp Lys Ile Asn Tyr Asp Gln					
	420		425		430
Val Leu Thr Ala Asp Gly Tyr Gln Trp Ile Ser Tyr Lys Ser Tyr Ser					
	435		440		445
Gly Val Arg Arg Tyr Ile Pro Val Lys Lys Leu Thr Thr Ser Ser Glu					
	450		455		460
Lys Ala Lys Asp Glu Ala Thr Lys Pro Thr Ser Tyr Pro Asn Leu Pro					
465		470		475	480
Lys Thr Gly Thr Tyr Thr Phe Thr Lys Thr Val Asp Val Lys Ser Gln					
	485		490		495
Pro Lys Val Ser Ser Pro Val Glu Phe Asn Phe Gln Lys Gly Glu Lys					
	500		505		510
Ile His Tyr Asp Gln Val Leu Val Val Asp Gly His Gln Trp Ile Ser					
	515		520		525
Tyr Lys Ser Tyr Ser Gly Ile Arg Arg Tyr Ile Glu Ile					
	530		535		540

<210> 4
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus* del grupo B
 <400> 4

5

ES 2 382 893 T3

Asp Gln Thr Thr Ser Val Gln Val Asn Asn Gln Thr Gly Thr Ser Val
 1 5 10 15
 Asp Ala Asn Asn Ser Ser Asn Glu Thr Ser Ala Ser Ser Val Ile Thr
 20 25 30
 Ser Asn Asn Asp Ser Val Gln Ala Ser Asp Lys Val Val Asn Ser Gln
 35 40 45
 Asn Thr Ala Thr Lys Asp Ile Thr Thr Pro Leu Val Glu Thr Lys Pro
 50 55 60
 Met Val Glu Lys Thr Leu Pro Glu Gln Gly Asn Tyr Val Tyr Ser Lys
 65 70 75 80
 Glu Thr Glu Val Lys Asn Thr Pro Ser Lys Ser Ala Pro Val Ala Phe
 85 90 95
 Tyr Ala Lys Lys Gly Asp Lys Val Phe Tyr Asp Gln Val Phe Asn Lys
 100 105 110
 Asp Asn Val Lys Trp Ile Ser Tyr Lys Ser Phe Gly Gly Val Arg Arg
 115 120 125
 Tyr Ala Ala Ile Glu Ser Leu Asp Pro Ser Gly Gly Ser Glu Thr Lys
 130 135 140
 Ala Pro Thr Pro Val Thr Asn Ser Gly Ser Asn Asn Gln Glu Lys Ile
 145 150 155 160
 Ala Thr Gln Gly Asn Tyr Thr Phe Ser His Lys Val Glu Val Lys Asn
 165 170 175

ES 2 382 893 T3

Glu Ala Lys Val Ala Ser Pro Thr Gln Phe Thr Leu Asp Lys Gly Asp
 180 185 190
 Arg Ile Phe Tyr Asp Gln Ile Leu Thr Ile Glu Gly Asn Gln Trp Leu
 195 200 205
 Ser Tyr Lys Ser Phe Asn Gly Val Arg Arg Phe Val Leu Leu Gly Lys
 210 215 220
 Ala Ser Ser Val Glu Lys Thr Glu Asp Lys Glu Lys Val Ser Pro Gln
 225 230 235 240
 Pro Gln Ala Arg Ile Thr Lys Thr Gly Arg Leu Thr Ile Ser Asn Glu
 245 250 255
 Thr Thr Thr Gly Phe Asp Ile Leu Ile Thr Asn Ile Lys Asp Asp Asn
 260 265 270
 Gly Ile Ala Ala Val Lys Val Pro Val Trp Thr Glu Gln Gly Gly Gln
 275 280 285
 Asp Asp Ile Lys Trp Tyr Thr Ala Val Thr Thr Gly Asp Gly Asn Tyr
 290 295 300
 Lys Val Ala Val Ser Phe Ala Asp His Lys Asn Glu Lys Gly Leu Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ile His Leu Tyr Tyr Gln Glu Ala Ser Gly Thr Leu Val Gly Val
 325 330 335
 Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Ala Gly Thr Asn Ser Ser Gln Glu Pro
 340 345 350
 Ile Glu Asn Gly Leu Pro Lys Thr Gly Val Tyr Asn Ile Ile Gly Ser
 355 360 365
 Thr Glu Val Lys Asn Glu Ala Lys Ile Ser Ser Gln Thr Gln Phe Thr
 370 375 380
 Leu Glu Lys Gly Asp Lys Ile Asn Tyr Asp Gln Val Leu Thr Ala Asp
 385 390 395 400

ES 2 382 893 T3

Gly Tyr Gln Trp Ile Ser Tyr Lys Ser Tyr Ser Gly Val Arg Arg Tyr
 405 410 415
 Ile Pro Val Lys Lys Leu Thr Thr Ser Ser Glu Lys Ala Lys Asp Glu
 420 425 430
 Ala Thr Lys Pro Thr Ser Tyr Pro Asn Leu Pro Lys Thr Gly Thr Tyr
 435 440 445
 Thr Phe Thr Lys Thr Val Asp Val Lys Ser Gln Pro Lys Val Ser Ser
 450 455 460
 Pro Val Glu Phe Asn Phe Gln Lys Gly Glu Lys Ile His Tyr Asp Gln
 465 470 475 480
 Val Leu Val Val Asp Gly His Gln Trp Ile Ser Tyr Lys Ser Tyr Ser
 485 490 495
 Gly Ile Arg Arg Tyr Ile Glu Ile
 500

<210> 5
 <211> 1590
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus* del grupo B
 <400> 5

5

atgaagatta aaaaaattat tagtggcttt gccgcagctt taattatcag ttcactatca 60
 actattaact atgagggttaa agctgatgac accaccagtg agtatcacta tatcagtaag 120
 caaaataatg aaaagcagct tattagttac atcaaggaac aacatcgttt gctcaatcaa 180
 tttgttggtg ataatgtcaa ctcatcact caactaaatg ctaatccaac tattgaacag 240
 ttaaatagag ctataacatt atttaaacia aaagatgagc aattatctaa ccaggtgaaa 300
 gctggtcac tctctcccag taactataat gctatcgta atcaacgtaa tgcattaac 360
 caaactgttc aaaatctgat tgacccaaat cataataaga ttcagacaag tcaaaataaa 420

ES 2 382 893 T3

gcagctcagc tcgtggggca acgtaatcag gttgtaaca aaattcaagc tatttttagca 480
 actgtaaaact acaactctgt gaattctata caagaagctg aaaatttatt tcattcactc 540
 agaaatcaaa ttgaacctct tgtagetgaa gtaataaatt acaaagctgc tatggcaatc 600
 cttcaacaag aagtagatgc cctatcaaca gcggtattg aaactgagac ttctaaactt 660
 gctactctca aagttagcga aaatacttct gttcctgcaa acaaagtaga agaaaaaact 720
 actcaatcag aagcgtcagg caataaaca gaagtaacta agagtgagga aaaacagget 780
 acctctgatg caaaggcatc acagcctgag tcagctaata ttgccgatta cgatagttta 840
 aaagaagttt tacgaaataa tattagcaac caagtaccac acatcagtgt tcaaatggag 900
 tttaaaactc aagaacaagt tgacgaatac caaaaaaatc tcggaagcat catccgggaa 960
 attggagata cacttggaac agcaactgaa ttcaatgcc aagtaacat tagcacttat 1020
 actcttggtg gacaaatcca acgcattatt gtaaaaagcg acatcacaat cacctatact 1080
 cttaaaggtg acatggtagg attacataaa gaatataaac agttttaga ttcttttgtc 1140
 aaagaaaata ttactaaca aaatatacaca agtgattatg aaaaagctaa agtaattcat 1200
 gaccacttgg ttaataatta cacttacgcg actgaagaac tggcaaccac tcgtgaaact 1260
 gctagtggta tcagtatcca tgctcctgaa gcactctaca aagataaacg tgggtgttgt 1320
 caagcctttg cagtaatggt taaagatarg gctgctgctg gcttatcagt atggtagta 1380
 actggtcaag ctggaggtgg aaatcacgct tggaacattg ttactattaa tggcgttaaa 1440
 tattatggtg atacaacatg ggataataat ataaaaagca ataaatattt ccttgttgg 1500
 aaaacaataa tggatgctga tcactctttg gatagtcaat acaatgcatt agctaaagat 1560
 attccagctg atcgccatca aggtgcataa 1590

<210> 6
 <211> 1506
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus* del grupo B
 <400> 6

5

gatgacacca ccagtgagta tcactatatac agtaagcaaa ataataaaaa gcagcttatt 60

ES 2 382 893 T3

agttacatca aggaacaaca tcgtttgctc aatcaatttg ttggtgataa tgcactca 120
 ttcaactcaac taaatgctaa tccaactatt gaacagttaa atagagctat aacattat 180
 aaacaaaaag atgagcaatt atttaaccag gtgaaagctg gtcactcttc tcccagtaac 240
 tataatgcta tcgttaatca acgtaatgtc attaaccaaa ctggtcaaaa tctgattgac 300
 caaaatcata ataagattca gacaagtcaa aataaagcag ctgagctcgt ggggcaacgt 360
 aatcaggttg ttaacaaaat tcaagctatt ttagcaactg taaactacaa ctctgtgaat 420
 tctatacaag aagctgaaaa tttatttcat tcactcagaa atcaaattga acctcttga 480
 gctgaagtta ataattacaa agctgctatg gcaatccttc aacaagaagt agatgcctta 540
 tcaacagcgg ctattgaaac tgagacttct aaacttgcta ctctcaaagt tagcgaaaat 600
 acttctgttc ctgcaaaaa agtagaagaa aaaactactc aatcagaagc gtcaggcaat 660
 aaacaagaag taactaagag tgaggaaaaa caggctacct ctgatgcaa ggcacacag 720
 cctgagtcag ctaatatgct cgattacgat agtttaaaag aagttttacg aaataatatt 780
 agcaaccaag taccacacat cagtgttcaa atggagtta aaactcaaga acaagttgac 840
 gaataccaaa aaaatctcgg aagcatcctc cgggaaattg gagatacact tggaacagca 900
 actgaattca atgcaaaaag taacattagc acttatactc ttggtggaca aatccaacgc 960
 attattgtaa aaagcgacat cacaatcacc tatactctta aagggtgacat ggtaggatta 1020
 cataaagaat ataaacagtt tgtagattct tttgtcaaag aaaatattac taacaaaaat 1080
 atcacaagtg attatgaaaa agctaaagta atccatgacc acttggttaa taattacact 1140
 tacgcgactg aagaactggc aaccactcgt gaaactgcta gtggtatcag tatccatgct 1200
 cctgaagcac tctacaaaga taaacgtggg gtttgtaag cctttgcagt aatgtttaa 1260
 gatatggctg ctgctggctt atcagtatgg tatgtaactg gtcaagctgg aggtggaaat 1320
 cacgcttggg acattgttac tattaatggc gttaaatatt atgttgatac aacatgggat 1380
 aataatataa aaagcaataa atatttcctt gttggtaaaa caataatgga tgctgatcat 1440
 cttttggata gtcaatacaa tgcattagct aaagatattc cagctgatcg ccatcaaggt 1500
 gcataa 1506

<210> 7
 <211> 529
 <212> PRT
 <213> *Streptococcus* del grupo B
 <400> 7

5

ES 2 382 893 T3

Met Lys Ile Lys Lys Ile Ile Ser Gly Phe Ala Ala Ala Leu Ile Ile
 1 5 10 15

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

Ser Glu Tyr His Tyr Ile Ser Lys Gln Asn Asn Glu Lys Gln Leu Ile
 35 40 45

Ser Tyr Ile Lys Glu Gln His Arg Leu Leu Asn Gln Phe Val Val Asp
 50 55 60

Asn Val Asn Ser Phe Thr Gln Leu Asn Ala Asn Pro Thr Ile Glu Gln
 65 70 75 80

Leu Asn Arg Ala Ile Thr Leu Phe Lys Gln Lys Asp Glu Gln Leu Phe
 85 90 95

Asn Gln Val Lys Ala Gly His Leu Ser Pro Ser Asn Tyr Asn Ala Ile
 100 105 110

Val Asn Gln Arg Asn Val Ile Asn Gln Thr Val Gln Asn Leu Ile Asp
 115 120 125

Gln Asn His Asn Lys Ile Gln Thr Ser Gln Asn Lys Ala Ala Gln Leu
 130 135 140

Val Gly Gln Arg Asn Gln Val Val Asn Lys Ile Gln Ala Ile Leu Ala
 145 150 155 160

Thr Val Asn Tyr Asn Ser Val Asn Ser Ile Gln Glu Ala Glu Asn Leu
 165 170 175

Phe His Ser Leu Arg Asn Gln Ile Glu Pro Leu Val Ala Glu Val Asn
 180 185 190

ES 2 382 893 T3

Asn Tyr Lys Ala Ala Met Ala Ile Leu Gln Gln Glu Val Asp Ala Leu
 195 200 205
 Ser Thr Ala Ala Ile Glu Thr Glu Thr Ser Lys Leu Ala Thr Leu Lys
 210 215 220
 Val Ser Glu Asn Thr Ser Val Pro Ala Asn Lys Val Glu Glu Lys Thr
 225 230 235 240
 Thr Gln Ser Glu Ala Ser Gly Asn Lys Gln Glu Val Thr Lys Ser Glu
 245 250 255
 Glu Lys Gln Ala Thr Ser Asp Ala Lys Ala Ser Gln Pro Glu Ser Ala
 260 265 270
 Asn Ile Ala Asp Tyr Asp Ser Leu Lys Glu Val Leu Arg Asn Asn Ile
 275 280 285
 Ser Asn Gln Val Pro His Ile Ser Val Gln Met Glu Phe Lys Thr Gln
 290 295 300
 Glu Gln Val Asp Glu Tyr Gln Lys Asn Leu Gly Ser Ile Ile Arg Glu
 305 310 315 320
 Ile Gly Asp Thr Leu Gly Thr Ala Thr Glu Phe Asn Ala Lys Ser Asn
 325 330 335
 Ile Ser Thr Tyr Thr Leu Gly Gly Gln Ile Gln Arg Ile Ile Val Lys
 340 345 350
 Ser Asp Ile Thr Ile Thr Tyr Thr Leu Lys Gly Asp Met Val Gly Leu
 355 360 365
 His Lys Glu Tyr Lys Gln Phe Val Asp Ser Phe Val Lys Glu Asn Ile
 370 375 380
 Thr Asn Lys Asn Ile Thr Ser Asp Tyr Glu Lys Ala Lys Val Ile His
 385 390 395 400
 Asp His Leu Val Asn Asn Tyr Thr Tyr Ala Thr Glu Glu Leu Ala Thr
 405 410 415

ES 2 382 893 T3

Thr Arg Glu Thr Ala Ser Gly Ile Ser Ile His Ala Pro Glu Ala Leu
 420 425 430
 Tyr Lys Asp Lys Arg Gly Val Cys Gln Ala Phe Ala Val Met Phe Lys
 435 440 445
 Asp Met Ala Ala Ala Gly Leu Ser Val Trp Tyr Val Thr Gly Gln Ala
 450 455 460
 Gly Gly Gly Asn His Ala Trp Asn Ile Val Thr Ile Asn Gly Val Lys
 465 470 475 480
 Tyr Tyr Val Asp Thr Thr Trp Asp Asn Asn Ile Lys Ser Asn Lys Tyr
 485 490 495
 Phe Leu Val Gly Lys Thr Ile Met Asp Ala Asp His Leu Leu Asp Ser
 500 505 510
 Gln Tyr Asn Ala Leu Ala Lys Asp Ile Pro Ala Asp Arg His Gln Gly
 515 520 525
 Ala

- <210> 8
- <211> 501
- <212> PRT
- <213> *Streptococcus* del grupo B
- <400> 8

5

Asp Asp Thr Thr Ser Glu Tyr His Tyr Ile Ser Lys Gln Asn Asn Glu
 1 5 10 15
 Lys Gln Leu Ile Ser Tyr Ile Lys Glu Gln His Arg Leu Leu Asn Gln
 20 25 30
 Phe Val Val Asp Asn Val Asn Ser Phe Thr Gln Leu Asn Ala Asn Pro

ES 2 382 893 T3

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

ES 2 382 893 T3

260 265 270
 Phe Lys Thr Gln Glu Gln Val Asp Glu Tyr Gln Lys Asn Leu Gly Ser
 275 280 285
 Ile Ile Arg Glu Ile Gly Asp Thr Leu Gly Thr Ala Thr Glu Phe Asn
 290 295 300
 Ala Lys Ser Asn Ile Ser Thr Tyr Thr Leu Gly Gly Gln Ile Gln Arg
 305 310 315 320
 Ile Ile Val Lys Ser Asp Ile Thr Ile Thr Tyr Thr Leu Lys Gly Asp
 325 330 335
 Met Val Gly Leu His Lys Glu Tyr Lys Gln Phe Val Asp Ser Phe Val
 340 345 350
 Lys Glu Asn Ile Thr Asn Lys Asn Ile Thr Ser Asp Tyr Glu Lys Ala
 355 360 365
 Lys Val Ile His Asp His Leu Val Asn Asn Tyr Thr Tyr Ala Thr Glu
 370 375 380
 Glu Leu Ala Thr Thr Arg Glu Thr Ala Ser Gly Ile Ser Ile His Ala
 385 390 395 400
 Pro Glu Ala Leu Tyr Lys Asp Lys Arg Gly Val Cys Gln Ala Phe Ala
 405 410 415
 Val Met Phe Lys Asp Met Ala Ala Ala Gly Leu Ser Val Trp Tyr Val
 420 425 430
 Thr Gly Gln Ala Gly Gly Gly Asn His Ala Trp Asn Ile Val Thr Ile
 435 440 445
 Asn Gly Val Lys Tyr Tyr Val Asp Thr Thr Trp Asp Asn Asn Ile Lys
 450 455 460
 Ser Asn Lys Tyr Phe Leu Val Gly Lys Thr Ile Met Asp Ala Asp His
 465 470 475 480
 Leu Leu Asp Ser Gln Tyr Asn Ala Leu Ala Lys Asp Ile Pro Ala Asp
 485 490 495
 Arg His Gln Gly Ala
 500

ES 2 382 893 T3

<210> 9
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico DMAR172
 <400> 9
 10 cttggggaa catatgaggg gatctc 26
 <210> 10
 <211> 34
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico DMAR173
 20 <400> 10
 ctaaaaagat ttactcgaga attcaatat agcg 34
 <210> 11
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico DMAR373
 30 <400> 11
 atgaggggat ctctcagtac taagcaatct t 31
 <210> 12
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador oligonucleotídico DMAR374
 <400> 12
 ttaaattca atagcgac gaataccgga 30
 45 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico DMAR464
 <400> 13
 55 catagatcc ggatcaaact acatcggtc aag 33
 <210> 14
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico DMAR465
 <400> 14
 65 ccgggtcgac ttaaattca atagcgac g 31

<210> 15
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico DMAR204
 <400> 15
 10 cacaggagaa catatgaaga ttaaaaaaat tattaatggc ttgcc 46
 <210> 16
 <211> 31
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico DMAR205
 20 <400> 16
 ctttctcgag tgcacctga tggcgatcag c 31
 <210> 17
 <211> 41
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico DMAR466
 30 <400> 17
 catagatcc tgatgacacc accagtgagt atcactatat c 41
 <210> 18
 <211> 33
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico DMAR467
 40 <400> 18
 catagtcgac ttatgcacct tgatggcgat cag 33
 <210> 19
 <211> 28
 45 <212> PRT
 <213> *Streptococcus* del grupo B
 50 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(28)
 <400> 19
 55
 Met Lys Ile Lys Lys Ile Ile Ser Gly Phe Ala Ala Ala Leu Ile Ile
 1 5 10 15
 Ser Ser Leu Ser Thr Ile Asn Tyr Glu Val Lys Ala
 20 25
 <210> 20
 <211> 5

ES 2 382 893 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Motivo de anclaje a la pared celular

10 <221> VARIANTE
<222> (1)...(5)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido
<400> 20

Leu Pro Xaa Thr Gly

1 5

15 <210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Motivo de unión a IgA
<400> 21

Met Leu Lys Lys Ile Glu

1 5

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido elegido de:
 - 5 (a) un polinucleótido 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°: 7 y 8;
 - (b) un polinucleótido 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°: 7 y 8;
 - (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia elegida de: SEC ID N°: 7 y 8;
 - 10 (d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que puede producir anticuerpos que tienen especificidad de unión por un polipéptido que tiene una secuencia elegida de SEC ID N°: 7 y 8;
 - (e) un polinucleótido que codifica un epítipo que lleva la porción de un polipéptido que tiene una secuencia elegida de SEC ID N°: 7 y 8; y
 - (f) un polinucleótido complementario a un polinucleótido en (a), (b), (c), (d) o (e).
2. El polinucleótido aislado según la reivindicación 1 seleccionado de
 - 15 (a) un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica al menos el 80% a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 5 ó 6;
 - (b) un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica al menos el 90% a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 5 ó 6;
 - 20 (c) un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos idéntica al menos el 95% a la secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 5 ó 6; y
 - (d) un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos expuesta en SEC ID N°: 5 ó 6.
3. El polinucleótido aislado de tanto la reivindicación 1 como la reivindicación 2, en el que dicho polinucleótido es ADN.
4. El polinucleótido aislado de tanto la reivindicación 1 como la reivindicación 2, en el que dicho polinucleótido es ARN.
5. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1 que se hibrida bajo condiciones rigurosas con tanto
 - (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido como
 - (b) el complemento de un polinucleótido que codifica el polipéptido;
 en el que dicho polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en tanto SEC ID N°: 7 como SEC ID N°: 8.
6. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1, parte (e), que se hibrida bajo condiciones rigurosas con tanto
 - (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido como
 - (b) el complemento de un polinucleótido que codifica el polipéptido;
 en el que dicho polipéptido comprende al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 8.
7. Un vector que comprende el polinucleótido aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho polinucleótido aislado está operativamente ligado a una región de control de la expresión.
8. Una célula huésped transfectada con el vector de la reivindicación 7.
9. Un procedimiento para producir un polipéptido codificado por el polinucleótido aislado según tanto la reivindicación 1 como la reivindicación 2, comprendiendo dicho procedimiento cultivar la célula huésped según la reivindicación 8 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido.
10. Un polipéptido aislado elegido de:
 - (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 70% a la secuencia de aminoácidos expuesta en tanto SEC ID N°: 7 como SEC ID N°: 8;
 - 45 (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 90% a la secuencia de aminoácidos expuesta en tanto SEC ID N°: 7 como SEC ID N°: 8;
 - (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos el 95% a la secuencia de aminoácidos expuesta en tanto SEC ID N°: 7 como SEC ID N°: 8;
 - (d) un polipéptido que comprende una secuencia elegida de: SEC ID N°: 7 y 8;
 - 50 (e) un polipéptido que puede producir anticuerpos que tienen especificidad de unión por un polipéptido que tiene una secuencia elegida de SEC ID N°: 7 y 8;
 - (f) un polipéptido que comprende un epítipo que lleva la porción de un polipéptido que tiene una secuencia elegida de SEC ID N°: 7 y 8;

(g) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que el residuo Met del extremo N está deletado; y
 (h) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f) en el que la secuencia de aminoácidos secretora está deletada.

11. Un polipéptido quimérico que comprende el polipéptido aislado de SEC ID N°: 7 u 8.
- 5 12. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido aislado según la reivindicación 10 o el polipéptido quimérico según la reivindicación 11 y un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
13. Uso del polipéptido aislado según la reivindicación 10 o el polipéptido quimérico según la reivindicación 11 para la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o profiláctico de infección bacteriana por *Streptococcus* del grupo B (GBS) en un individuo.
- 10 14. Uso según la reivindicación 13, en el que el individuo es un neonato o un lactante.
15. Uso según la reivindicación 13 ó 14, en el que dicha infección es septicemia, meningitis, neumonía, celulitis, osteomielitis, artritis séptica, endocarditis o epiglotis.
16. Uso según la reivindicación 13, en el que el individuo es una mujer embarazada.
- 15 17. Uso según la reivindicación 13 o la reivindicación 16, en el que dicha infección es una infección urinaria, septicemia, meningitis, osteomielitis, endocarditis, amnionitis, endometritis, infección por heridas poscesárea, infección por heridas postepisiotomía, celulitis o fascitis.
18. Uso según la reivindicación 13, en el que el individuo es un adulto no embarazado.
19. Uso según la reivindicación 18, en el que dicha infección es bacteremia primaria, piel de una infección de tejido blando, neumonía, urosepticemia, endocarditis, peritonitis, meningitis o empiema.
- 20 20. Uso según la reivindicación 13, en el que el individuo es una vaca.
21. Uso según la reivindicación 20, en el que dicha infección es mastitis.
22. Un procedimiento para diagnosticar una infección bacteriana por *Streptococcus* del grupo B (GBS) en un individuo susceptible a infección por GBS que comprende
- 25 a) incubar un anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, con una muestra biológica del individuo para formar una mezcla, en el que el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, tiene especificidad de unión por un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID N°: 7 u 8; y
- b) detectar anticuerpo específicamente unido, o fragmento de unión a antígeno del mismo, en la mezcla que indica la presencia de GBS.
- 30 23. Kit que comprende el polipéptido aislado según la reivindicación 10 o el polipéptido quimérico según la reivindicación 11 para la detección o diagnóstico de infección por GBS.

Figura 1 (SEC ID N°: 1)

```

1 ATGAGGGGAT CTCTCAGTAC TAAGCAATCT TACTCTCTAC GTAAATATAA ATTTGGTTTA
61 GCATCAGTAA TTTTAGGGTC ATTCATAATG GTCACAAGTC CTGTTTTTGC GGATCAAAC
121 ACATCGGTTC AAGTTAATAA TCAGACAGGC ACTAGTGTGG ATGCTAATAA TTCCTCCAAT
181 GAGACAAGTG CGTCAAGTGT GATTACTTCC AATAATGATA GTGTTCAAGC GTCTGATAAA
241 GTTGTAAATA GTCAAAATAC GGCAACAAAG GACATTACTA CTCCTTTAGT AGAGACAAAG
301 CCAATGGTGG AAAAAACATT ACCTGAACAA GGGAATTATG TTTATAGCAA AGAAACCGAG
361 GTGAAAAATA CACCTTCAAA ATCAGCCCCA GTAGCTTTCT ATGCAAAGAA AGGTGATAAA
421 GTTTTCTATG ACCAAGTATT TAATAAAGAT AATGTGAAAT GGATTTTATA TAAGTCTTTT
481 GGTGGCGTAC GTCGATACGC AGCTATTGAG TCACTAGATC CATCAGGAGG TTCAGAGACT
541 AAAGCACCTA CTCCTGTAAC AAATTCAGGA AGCAATAATC AAGAGAAAAT AGCAACGCAA
601 GGAAATPATA CATTTTCACA TAAAGTAGAA GTAAAAAATG AAGCTAAGGT AGCGAGTCCA
661 ACTCAATTTA CATTTGACAA AGGAGACAGA ATTTTTTACG ACCAAATACT AACTATTGAA
721 GGAAATCAGT GGTATCTTA TAAATCATTC AATGGTGTTC GTCGTTTTGT TTTGCTAGGT
781 AAAGCATCTT CAGTAGAAAA AACTGAAGAT AAAGAAAAAG TGTCTCCTCA ACCACAAGCC
841 CGTATFACTA AAACCTGGTAG ACTGACTATT TCTAACGAAA CAACTACAGG TTTTGATATT
901 TTAATTACGA ATATTAAGA TGATAACGGT ATCGCTGCTG TTAAGGTACC GGTTTGGACT
961 GAACAAGGAG GGCAAGATGA TATTAATGG TATACAGCTG TAACTACTGG GGATGGCAAC
1021 TACAAAGTAG CTGTATCATT TGCTGACCAT AAGAATGAGA AGGGTCTTTA TAATATTCAT
1081 TTATACTACC AAGAAGCTAG TGGGACACTT GTAGGTGTAA CAGGAACTAA AGTGACAGTA
1141 GCTGGAACTA ATTCTTCTCA AGAACCTATT GAAAATGGTT TACCAAAGAC TGGTGTTTAT
1201 AATATTATCG GAAGTACTGA AGTAAAAAAT GAAGCTAAAA TATCAAGTCA GACCCAATTT
1261 ACTTTAGAAA AAGGTGACAA AATAAATTAT GATCAAGTAT TGACAGCAGA TGTTTACCAG
1321 TGGATTTCTT ACAAATCTTA TAGTGGTGTT CGTCGCTATA TTCCTGTGAA AAAGCTAACT
1381 ACAAGTAGTG AAAAAGCGAA AGATGAGGCG ACTAAACCGA CTAGTTATCC CAACTTACCT
1441 AAAACAGGTA CCTATACATT TACTAAAAC TTAGATGTGA AAAGTCAACC TAAAGTATCA
1501 AGTCCAGTGG AATTTAATTT TCAAAAGGGT GAAAAAATAC ATTATGATCA AGTGTTAGTA
1561 GTAGATGGTC ATCAGTGGAT TTCATACAAG AGTTATTCCG GTATTCGTCC CTATATTGAA
1621 ATTTAA

```

Figura 2 (SEC ID N°: 2)

```

1 GATCAAAC TA CATCGGTTCA AGTTAATAAT CAGACAGGCA CTAGTGTGGA TGCTAATAAT
61 TCTTCCAATG AGACAAGTGC GTCAAGTGTG ATTACTTCCA ATAATGATAG TGTTCAAGCG
121 TCTGATAAAG TTGTAATAG TCAAAATACG GCAACAAAGG ACATTACTAC TCCTTTAGTA
181 GAGACAAAGC CAATGGTGGG AAAAACATTA CCTGAACAAG GGAATTATGT TTATAGCAAA
241 GAAACCGAGG TGAAAAATAC ACCTTCAAAA TCAGCCCCAG TAGCTTTCTA TGCAAAGAAA
301 GGTGATAAAG TTTTCTATGA CCAAGTATTT AATAAAGATA ATGTGAAATG GATTTTCATAT
361 AAGTCTTTTG GTGGCGTACG TCGATACGCA GCTATTGAGT CACTAGATCC ATCAGGAGGT
421 TCAGAGACTA AAGCACCTAC TCCTGTAACA AATTCAGGAA GCAATAATCA AGAGAAAATA
481 GCAACGCAAG GAAATTATAC ATTTTCACAT AAAGTAGAAG TAAAAAATGA AGCTAAGGTA
541 GCGAGTCCAA CTCAATTTAC ATTGGACAAA GGAGACAGAA TTTTTTACGA CCAAATACTA
601 ACTATTGAAG GAAATCAGTG GTTATCTTAT AAATCATTCA ATGGTGTTCG TCGTTTTGTT
661 TTGCTAGGTA AAGCATCTTC AGTAGAAAAA ACTGAAGATA AAGAAAAAGT GTCTCCTCAA
721 CCACAAGCCC GTATTACTAA AACTGGTAGA CTGACTATTT CTAACGAAAC AACTACAGGT
781 TTTGATATTT TAATTACGAA TATTAAAGAT GATAACGGTA TCGCTGCTGT TAAGGTACCG
841 GTTTGGACTG AACCAAGGAGG GCAAGATGAT ATTAAATGGT ATACAGCTGT AACTACTGGG
901 GATGGCAACT ACAAAGTAGC TGTATCATT TCTGACCATA AGAATGAGAA GGGTCTTTAT
961 AATATTCATT TATACTACCA AGAAGCTAGT GGGACACTTG TAGGTGTAAC AGGAACTAAA
1021 GTGACAGTAG CTGGAACTAA TTCTTCTCAA GAACCTATTG AAAATGGTTT ACCAAAGACT
1081 GGTGTTTATA ATATTATCGG AAGTACTGAA GTAAAAAATG AAGCTAAAAT ATCAAGTCAG
1141 ACCCAATTTA CTTTAGAAAA AGGTGACAAA ATAAATTATG ATCAAGTATT GACAGCAGAT
1201 GGTACCAGT GGATTTCTTA CAAATCTTAT AGTGGTGTTC GTCGCTATAT TCCTGTGAAA
1261 AAGCTAACTA CAAGTAGTGA AAAAGCGAAA GATGAGGCGA CTAACCCGAC TAGTTATCCC
1321 AACTTACCTA AAACAGGTAC CTATACATTT ACTAAAAC TG TAGATGTGAA AAGTCAACCT
1381 AAAGTATCAA GTCCAGTGGA ATTTAATTTT CAAAAGGGTG AAAAAATACA TTATGATCAA
1441 GTGTTAGTAG TAGATGGTCA TCAGTGGATT TCATACAAGA GTTATTCCGG TATTCGTCGC
1501 TATATTGAAA TTTAA

```

Figura 3 (SEC ID N°: 3)

```

1 MRGSLSTKQS YSLRKYKFGL ASVILGSFIM VTSPVFADQT TSVQVNNQTG TSVDANNSSN
61 ETSASSVITS NNDVQASDK VVNSQNTATK DITTPLVETK PMVEKTLPEQ GNYVYSKETE
121 VKNTPSKSAP VAFYAKKGDK VFYDQVFNKD NVKWISYKSF GGVRRYAAIE SLDPSGGSET
181 KAPTPVTNSG SMNQEKIATQ GNYTFSHKVE VKNEAKVASP TQFTLDKGDR IFYDQILTIE
241 GNQWLSYKSF NGVRRFVLLG KASSVEKTED KEKVSPQPQA RITKTGRLTI SNETTTGFDI
301 LITNIKDDNG IAAVKVPVWT EQGGQDDIKW YTAVTTGDGN YKVAVSFADH KNEKGLYNIH
361 LYYQEASGTL VGVGTGKVTV AGTNSSQEPI ENGLPKTGVY NIIGSTEVKN EAKISSQTQF
421 TLEKGDKINY DQVLTADGYQ WISYKSYSGV RRYIPVKKLT TSSEKAKDEA TKPTSYPNLP
481 KTGTYTFPKT VDVKSQPKVS SPVEFNFOKG EKIHYDQVLV VDGHWISYK SYSGIRRYIE
541 I*

```

Figura 4 (SEC ID N°: 4)

```

1 DQTTSVQVNN QTGTSVDANN SSNETSASSV ITSNNDSVQA SDKVVNSQNT ATKDITTPLV
61 ETKPMVEKTL PEQGNVYVYSK ETEVKNTPSK SAPVAFYAKK GDKVPYDQVF NKDNVWISY
121 KSPGGVRRYA AIESLDPSGG SETKAPTPVT NSGSNNQEKI ATQGNVYTFSH KVEVKNEAKV
181 ASPTQFTLDK GDRIFYDQIL TIEGNOWLSY KSFNGVRRFV LLGKASSVEK TEDKEKVSPQ
241 PQARITKTGR LTISNETTTG FDILITNIKD DNGIAAVKVP VWTEQGGQDD IKWYTAVTTG
301 DGNYKVAVSF ADHKNEKGLY NIHLYYQEAS GTLVGVTGTK VTVAGTNSSQ EPIENGLPKT
361 GVYNIIGSTE VKNEAKISSQ TQFTLEKGDK INYDQVLTAD GYQWISYKSY SGVRRYIPVK
421 KLTTSSSEKAK DEATKPTSYP NLPKTGTYTF TKTVDVKSQP KVSSPVEFNF QKGEKIHYDQ
481 VLVVDGHQWI SYKSYSGIRR YIEI*

```

Figura 5 (SEC ID N°: 5)

```

1  ATGAAGATTA  AAAAAATTAT  TAGTGGCTTT  GCCGCAGCTT  TAATTATCAG  TTCACTATCA
61  ACTATTAACT  ATGAGGTAA  AGCTGATGAC  ACCACCAGTG  AGTATCACTA  TATCAGTAAG
121  CAAAATAATG  AAAAGCAGCT  TATTAGTTAC  ATCAAGGAAC  AACATCGTTT  GCTCAATCAA
181  TTTGTTGTTG  ATAATGTCAA  CTCATTCACT  CAACTAAATG  CTAATCCAAC  TATTGAACAG
241  TTAATAGAG  CTATAACATT  ATTTAAACAA  AAAGATGAGC  AATTATTTAA  CCAGGTGAAA
301  GCTGGTCATC  TCTCTCCCAG  TAACTATAAT  GCTATCGTTA  ATCAACGTAA  TGTCAATTAAC
361  CAAACTGTTT  AAAATCTGAT  TGACCAAAAT  CATAATAAGA  TFCAGACAAG  TCAAAAATAAA
421  GCAGCTCAGC  TCGTGGGGCA  ACGTAATCAG  GTTGTTAACA  AAATTCAAGC  TATTTTAGCA
481  ACTGTAAACT  ACAACTCTGT  GAATTCCTATA  CAAGAAGCTG  AAAATTTATT  TCATTCACTC
541  AGAAATCAAA  TTGAACCTCT  TGTAGCTGAA  GTTAATAATT  ACAAAGCTGC  TATGGCAATC
601  CTTCAACAAG  AAGTAGATGC  CCTATCAACA  GCGGCTATTG  AAACFGAGAC  TTCTAAACTT
661  GCTACTCTCA  AAGTTAGCGA  AAATACTTCT  GTTCCTGCAA  ACAAAGTAGA  AGAAAAAACT
721  ACTCAATCAG  AAGCGTCAGG  CAATAACAA  GAAGTAACTA  AGAGTGAGGA  AAAACAGGCT
781  ACCTCTGATG  CAAAGGCATC  ACAGCCTGAG  TCAGCTAATA  TTGCCGATTA  CGATAGTTTA
841  AAAGAAGTTT  TACGAAATAA  TATTAGCAAC  CAAGTACCAC  ACATCAGTGT  TCAAATGGAG
901  TTTAAAACCT  AAGAACAAGT  TGACGAATAC  CAAAAAATC  TCGGAAGCAT  CATCCGGGAA
961  ATTGGAGATA  CACTTGGAAC  AGCAACTGAA  TTCAATGCCA  AAAGTAACAT  TAGCACTTAT
1021  ACTCTTGGTG  GACAAATCCA  ACGCATTATT  GTAAAAAGCG  ACATCACAAT  CACCTATACT
1081  CPTAAAGGTG  ACATGGTAGG  ATTACATAAA  GAATATAAAC  AGTTTGTAGA  TTCTTTTGTC
1141  AAAGAAAATA  TTAATAACAA  AAATATCACA  AGTGATTATG  AAAAAGCTAA  AGTAATTCAT
1201  GACCACTTGG  TTAATAATTA  CACTTACGCG  ACTGAAGAAC  TGGCAACCAC  TCGTGAAACT
1261  GCTAGTGGTA  TCAGTATCCA  TGCTCCTGAA  GCACTCTACA  AAGATAAACG  TGGTGTTTGT
1321  CAAGCCTTTG  CAGTAATGTT  TAAAGATATG  GCTGCTGCTG  GCTTATCAGT  ATGGTATGTA
1381  ACTGGTCAAG  CTGGAGGTGG  AAATCACGCT  TGGAACATTG  TTAATATTA  TGGCGTTAAA
1441  TATTATGTTG  ATACAACATG  GGATAATAAT  ATAAAAAGCA  ATAAATATTT  CCTTGTGGT
1501  AAAACAATAA  TGGATGCTGA  TCATCTTTTG  GATAGTCAAT  ACAATGCATF  AGCTAAAGAT
1561  ATTCCAGCTG  ATCGCCATCA  AGGTGCATAA

```

Figura 6 (SEC ID N°: 6)

```

1  GATGACACCA  CCAGTGAGTA  TCACTATATC  AGTAAGCAAA  ATAATGAAAA  GCAGCTTATT
61  AGTTACATCA  AGGAACAACA  TCGTTTGCTC  AATCAATTTG  TTGTTGATAA  TGTCAACTCA
121  TTCACTCAAC  TAAATGCTAA  TCCAACATAT  GAACAGTTAA  ATAGAGCTAT  AACATTATTT
181  AAACAAAAG  ATGAGCAATT  ATTTAACCAG  GTGAAAGCTG  GTCATCTCTC  TCCCAGTAAC
241  TATAATGCTA  TCGTTAATCA  ACGTAATGTC  ATTAACCAA  CTGTTCAAAA  TCTGATTGAC
301  CAAAATCATA  ATAAGATTCA  GACAAGTCAA  AATAAAGCAG  CTCAGCTCGT  GGGGCAACGT
361  AATCAGGTTG  TTAACAAAAT  TCAAGCTATT  TTAGCAACTG  TAAACTACAA  CTCTGTGAAT
421  TCTATACAAG  AAGCTGAAAA  TTTATTTTCA  TCACTCAGAA  ATCABATGA  ACCTCTTGTA
481  GCTGAAGTTA  ATAATTACAA  AGCTGCTATG  GCAATCCTTC  AACCAAGAAG  AGATGCCCTA
541  TCAACAGCGG  CTATTGAAAC  TGAGACTTCT  AAACCTGCTA  CTCTCAAAGT  TAGCGAAAAT
601  ACTTCTGTTC  CTGCAAACAA  AGTAGAAGAA  AAACTACTC  AATCAGAAGC  GTCAGGCAAT
661  AAACAAGAAG  TAAC TAAGAG  TGAGGAAAAA  CAGGCTACCT  CTGATGCAAA  GGCATCACAG
721  CCTGAGTCAG  CTAATATTGC  CGATTACGAT  AGTTTAAAAG  AAGTTTACG  AAATAATATT
781  AGCAACCAAG  TACCACACAT  CAGTGTTCAA  ATGGAGTTTA  AAACCAAGA  ACAAGTTGAC
841  GAATACCAA  AAAATCTCGG  AAGCATCATC  CGGGAAATTA  GAGATACT  TGGAACAGCA
901  ACTGAATTCA  ATGCCAAAAG  TAACATTAGC  ACTTATACTC  TTGGTGGACA  AATCCAACGC
961  ATTATTGTAA  AAAGCGACAT  CACAATCACC  TATACTCTTA  AAGGTGACAT  GGTAGGATTA
1021  CATAAAGAAT  ATAAACAGTT  TGTAGATTCT  TTTGTCAAAG  AAAATATTAC  TAACAAAAT
1081  ATCACAAGTG  ATTATGAAAA  AGCTAAAGTA  ATTCATGACC  ACTTGGTTAA  TAATTACACT
1141  TACGCGACTG  AAGAACTGGC  AACCCTCGT  GAAACTGCTA  GTGGTATCAG  TATCCATGCT
1201  CCTGAAGCAC  TCTACAAAGA  TAAACGTGGT  GTTTGTCAAG  CCTTTCAGT  AATGTTTAAA
1261  GATATGGCTG  CTGCTGGCTT  ATCAGTATGG  TATGTAAGT  GTCAAGCTGG  AGGTGGAAAT
1321  CACGCTTGA  ACATTGTTAC  TATTAATGGC  GTTAAATAT  ATGTTGATAC  AACATGGGAT
1381  AATAATATA  AAAGCAATA  ATATTTCTT  GTTGGTAAAA  CAATAATGGA  TGCTGATCAT
1441  CTTTTGGATA  GTCAATACAA  TGCATTAGCT  AAAGATATTC  CAGCTGATCG  CCATCAAGGT
1501  GCATAA

```


Figura 7 (SEC ID N°: 7)

```

1 MKIKKIISGF AAALISSL S TINYEVKADD TTSEYHYISK QNNEKQLISY IKEQHRLLNQ
61 FVVDNVNSPT QLNANPTIEQ LNRRAITLQKQ KDEQLFNQVK AGHLSPSNYN AIVNQRNVIN
121 QTVQNLIDQN HNKIQTSONK AAQLVGQRNQ VVNKIQAAILA TVNYSVNSI QBAENLFHSL
181 RNQIEPLVAE VNNYKAAMAI LQQEVDALST AAJETETSKL ATLVSENTS VPANKVEEKT
241 TQSEASGNKQ EVTKSEKQA TSDAKASQPE SANIADYDSL KEVLRNNISN QVPHISVQME
301 FKIQEQVDEY QKNLGSIIRE IGDTLGTATE FNAKSNISTY TLGGQIQRII VKSDITITYT
361 LKGDVMVGLHK EYKQFVDSFV KENITNKNIT SDYEKAKVIH DHLVNNYTYA TEELATTRET
421 ASGISIHAFE ALYKDKRGVC QAFAVMFKDM AAAGLSVWYV TQAGGGNHA WNIIVTINGVK
481 YYVDTTWDNN IKS NKYFLVG KTIMDADHLL DSQYNALAKD IPADRHQGA*

```

Figura 8 (SEC ID N°: 8)

```

1 DDTTSEYHYI SKQNEKQLI SYIKEQHRLI NQFVVDNVNS FTQLNANPTI EQLNRAITLF
61 KQKDEQLFNQ VKAGHLSPSN YNAIVNQRNV INQTVQNLID QNHNKIQT SQ NKAQLVGQR
121 NQVVNKIQAI LATVNYNSVN SIQEAENLFH SLRNQIEPLV AEVNNYKAAM AILQQEVDAL
181 STAAJETETS KLATLVSEN TSVPANKVEE KTTQSEASGN KQEVTKSEEK QATSDAKASQ
241 PESANIADYD SLKEVLRNNI SNQVPHISVQ MEFKTQEQVD EYQKNLGSII REIGDTLGT A
301 TEFNAKSNIS TYTLGGQIQR IIVKSDITIT YTLKGDVGL HKEYKQFVDS FVKENITNKN
361 ITSDYEKAKV IHDHLVNNYT YATEELATTR ETASGISIHA PEALYKDKRG VCQAFV MFK
421 DMAAAGLSVW YVTQAGGGN HAWNIVTING VKYYVDTTWD NNIKS NKYFL VGKTIMDADH
481 LLDSQYNALA KDIPADRHQGA*

```