

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 884**

51 Int. Cl.:

C12R 1/35 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07848315 .3**

96 Fecha de presentación: **03.10.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2080028**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.07.2009**

54 Título: **Uso de la proteína 7F4 en el diagnóstico in vitro de infecciones por mycoplasma pneumoniae**

30 Prioridad:
05.10.2006 FR 0608734

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.10.2012

73 Titular/es:
**InGen Biosciences
Technopolis 17 avenue du Parc
91380 Chilly Mazarin , FR y
Université Victor Segalen Bordeaux 2**

72 Inventor/es:
**CYNCYNATUS, Camille y
NUYTTENS, Hélène**

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 388 884 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

Uso de la proteína 7F4 en el diagnóstico *in vitro* de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*

5 [0001] La presente invención se refiere al uso de un polipéptido y de un polinucleótido en el campo del diagnóstico serológico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*.

10 [0002] *Mycoplasma pneumoniae* es una bacteria de crecimiento intracelular carente de pared y que invade las células epiteliales respiratorias. Es responsable de infecciones respiratorias agudas que se encuentran frecuentemente en los niños a partir de 5 años de edad y en adultos jóvenes. Estas infecciones pueden ser neumonías atípicas con evolución favorable, en ocasiones asociadas a otras manifestaciones ORL, cutáneas, hematológicas, neurológicas o, con más frecuencia, traqueobronquitis. Se estima que *Mycoplasma pneumoniae* es responsable de entre el 15 % y el 20 % de las neumopatías extrahospitalarias que se manifiestan en estado endémico con pequeños brotes epidémicos cada cuatro a siete años. (Bébéar C, Bébéar C.M et de Barbeyrac B. dans FreneyJ, Renaud F, Hansen W, Bollet C, Précis de bactériologie clinique, ed. ESKA, Paris, 2000).

20 [0003] Se observa un primer pico de incidencia en niños con edades comprendidas entre 5 a 15 años, en los cuales se cree que *Mycoplasma pneumoniae* sería responsable de casi el 40 % de los casos de neumonías extrahospitalarias, de los cuales casi el 20 % requiere hospitalización. El segundo pico de incidencia afecta a los adultos mayores de 50 años de edad, con cifras que aumentan gradualmente con la edad hasta superar el 30 % (Brunner H, *Mycoplasma pneumoniae* infections. Isr. J. Med Sci. (1981), 17:516 – 523; Ghosh et al. Surveillance of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Scotland 1986 – 1991. J Infect. (1992), 25: 221 – 227; Waites et al. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin. Microbiol. Rev. (2004), 17: 697 – 728). El considerable lapso entre la primoinfección en niños y la reinfección en adultos pone de manifiesto que la infección en el niño confiere a la persona una protección inmunitaria eficaz frente a la reinfección.

30 [0004] También se ha observado una asociación clínica entre *M. pneumoniae* y el asma infantil, si bien aún no se ha determinado claramente la naturaleza de la correlación. (Hansbro PM et al., Role of atypical bacterial infection of the lung in predisposition/protection of asthma. Pharmacology et Therapeutics (2004), 101: 193 – 210).

[0005] Parece que existe una subestimación frecuente de las infecciones tanto agudas como crónicas, por *M. pneumoniae* en niños, en patologías tales como el asma o las neumopatías extrahospitalarias.

35 [0006] *Mycoplasma pneumoniae* entra en el organismo por vía aérea (inhalación de gotas respiratorias (aerosoles), contacto directo con personas infectadas) al adherirse a las células del epitelio respiratorio. Este contacto genera un estrés oxidativo que tiene como resultado la alteración del movimiento ciliar y la formación de lesiones celulares, que desembocan en una reacción inflamatoria local. La reacción inmunológica puede conducir a la aparición de infiltrados y, en ocasiones, incluso de autoanticuerpos. Algunos antígenos de membrana de *M. pneumoniae* son de hecho similares a los antígenos que se encuentran en el cerebro y el páncreas. (Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen, Clin Microbiol Rev., 2004).

45 [0007] Muchos agentes infecciosos, sean virales o bacterianos, pueden estar en el origen de una neumonía y la sintomatología respiratoria apenas permite distinguir las infecciones por *M. pneumoniae* de las causadas por otros agentes de las neumonías atípicas. El inicio de la enfermedad es progresivo tras una incubación de entre 15 y 20 días. La enfermedad cursa con fiebre, malestar, cefaleas, mialgias y raquialgias y, sobre todo, una tos seca y persistente. El estado general aparece poco alterado y la exploración física muestra pocos síntomas, en contraste con la importancia de las imágenes radiológicas de los pulmones. Por lo general, la enfermedad es regresiva con el tiempo, si bien la convalecencia es larga y la tos es persistente. *M. pneumoniae* también puede causar diversas complicaciones extrapulmonares por dispersión a otros órganos: pleuresía, erupciones cutáneas, sinusitis, miocarditis, pericarditis, ataques articulares, anemia hemolítica, manifestaciones nerviosas, infecciones genitales. (Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen, Clin Microbiol Rev., 2004).

50 [0008] El tratamiento de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* se basa en una selección probabilística en función de la edad, especialmente en los niños, y en criterios clínicos y radiológicos, ninguno de los cuales resulta demasiado específico ni sensible.

60 [0009] La ausencia de pared hace que esta bacteria sea insensible a la penicilina y otras betalactaminas prescritas habitualmente en los casos de neumonía de origen bacteriano. En consecuencia, los antibióticos utilizados con frecuencia en las infecciones por *M. pneumoniae* son las tetraciclinas, las fluoroquinolonas, los macrólidos y compuestos relacionados. Sin embargo, ya se han observado casos de resistencia a las fluoroquinolonas y los macrólidos (Matsuoka, et al. Characterization and Molecular analysis of Macrolide-Resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48, 12: 4624 – 4630; Gruson D. et al. *In vitro* developpement of resistance to six and four fluoroquinolones in *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma hominis* respectively. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49, 3: 1190 – 1193). Estos problemas de

resistencia hacen que el diagnóstico de una infección por *M. pneumoniae* resulte fundamental para que el tratamiento con antibióticos sea apropiado y se administre precozmente.

5 **[0010]** En la actualidad, el diagnóstico directo se realiza mediante cultivo o reacción de polimerización en cadena (PCR). Como procedimientos de diagnóstico indirecto, existen pruebas serológicas, tales como las aglutininas frías, la reacción de fijación del complemento, la inmunofluorescencia indirecta, la aglutinación pasiva y las pruebas de ELISA. Sin embargo, no existe una prueba diagnóstica de referencia para la detección de las infecciones por *M. pneumoniae*.

10 **[0011]** El cultivo de *M. pneumoniae* puede llevarse a cabo a partir de muestras de garganta, de aspiraciones nasofaríngeas en niños y de lavados broncoalveolares, pero lleva mucho tiempo (de 2 a 3 semanas) y es laborioso. Rara vez realizan de forma rutinaria, y tiende a quedar reservado a los laboratorios de referencia. Sin embargo, si el resultado es positivo, es 100 % específico. Debido a que la bacteria puede persistir durante hasta varias semanas después de la infección, es necesario realizar pruebas complementarias, tales como la prueba de anticuerpos
15 específicos, con el fin de confirmar el diagnóstico de una infección activa.

[0012] La amplificación génica por PCR, a partir de muestras procedentes de las vías respiratorias, es un procedimiento más rápido y más sensible que el cultivo (de 100 muestras positivas por PCR, solamente 60 son positivas por cultivo). Se han propuesto diversos sistemas, tales como la amplificación de secuencias al azar, la
20 amplificación del gen de la adhesina o incluso del gen que codifica para el ARN 16S. Esta estrategia es sensible (entre el 78 % y el 92 %), y permite la detección de 10 a 100 ufc con buena especificidad (entre el 92 % y el 100 %) *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections, J. Clin. Microbiol., 2003). No obstante, no existen kits de detección disponibles comercialmente y, por lo tanto, la técnica no está normalizada y resulta muy costosa y demasiado compleja como para utilizarla de forma rutinaria en la mayoría de los laboratorios de microbiología
25 clínica.

[0013] Las serologías son los procedimientos utilizados con mayor frecuencia en el diagnóstico de la infección por *M. pneumoniae*, especialmente cuando no se disponga de muestras. Tras una infección por *M. pneumoniae*, el sistema inmunitario de un individuo no inmunodeprimido responde rápidamente con la producción de anticuerpos,
30 los cuales alcanzan su máxima concentración tras entre 3 y 6 semanas, y posteriormente descienden gradualmente durante un período que va desde varios meses hasta varios años. La producción de inmunoglobulinas M (IgM), específicas para *M. pneumoniae*, se produce entre 7 y 10 días después del inicio de la infección. Así, con frecuencia, su detección es la prueba de una infección reciente, especialmente en niños pequeños que no se han visto expuestos reiteradamente a la bacteria. Sin embargo, en adultos que han sufrido una exposición reiterada, la
35 infección por *M. pneumoniae* no provoca un rápido aumento de IgM y, en ese caso, las pruebas serológicas comerciales que detectan una respuesta de IgM pueden dar lugar a resultados incorrectos. Del mismo modo, debido a que la respuesta de las IgM puede durar meses o incluso años, el nivel de anticuerpos IgM no refleja necesariamente una infección reciente. En algunos casos, la reinfección conduce a un aumento de la concentración de IgG y, por esa razón, se recomienda buscar una respuesta de IgG y de IgM en paralelo. Las IgA se producen al principio de la infección, pero su nivel de producción disminuye más rápidamente que el de las IgG y las IgM. Estas pueden ser buenos indicadores de una infección reciente en todas las edades, incluso después de múltiples reinfecciones (Waites K.B., C.M. Bébéar, J.A. Robertson, D.F. Talkington, and G.E. Kenny. Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. Cumitech of American Society for Microbiology, coordinating editor: F.S. Nolte., 2001, ASM
40 press: 1 – 30).
45

[0014] Existen varias técnicas serológicas, que son a menudo complementarias, para diagnosticar una infección por *M. pneumoniae*. Las principales pruebas son la detección de aglutininas frías, la reacción de fijación del complemento, la inmunofluorescencia indirecta, la aglutinación pasiva y las pruebas de ELISA.

50 **[0015]** La presencia de aglutininas frías, indicativa a un nivel > 64, se observa en ocasiones en las infecciones por *M. pneumoniae*, pero no es una prueba ni coherente ni característica. Por consiguiente, esta técnica, que ha sido utilizada en el pasado, ya no se recomienda para la detección de la infección por *M. pneumoniae*.

[0016] La reacción de fijación del complemento (RFC), que utiliza una preparación de antígeno producida a partir del microorganismo entero, se ha utilizado durante mucho tiempo. La prueba mide la concentración de IgM y de IgG al mismo tiempo, sin distinguir entre ellas. Un nivel > 64 supone indicios de una infección. La técnica es muy complicada, adolece de baja sensibilidad y puede dar lugar a reacciones cruzadas o resultados que no puedan ser interpretados (sueros «anticomplementarios»).

60 **[0017]** La detección de anticuerpos específicos puede llevarse a cabo por inmunofluorescencia indirecta. El suero que se desea analizar, puesto en contacto con antígenos de *M. pneumoniae*, es revelado mediante anticuerpos anti-IgM o anti-IgG humanos conjugados con un fluorocromo. Esta técnica existe en forma de un kit comercial, si bien requiere el uso de un microscopio de fluorescencia. La lectura de los portaobjetos es larga y laboriosa, y la interpretación de los resultados sigue resultando complicada.

- 5 **[0018]** Existen en el mercado pruebas de aglutinación pasivos para la detección de IgM y/o de IgG. Estas pruebas se basan en un reconocimiento por parte de los anticuerpos, contenidos en el suero del paciente, de unos antígenos (extraídos de *M. pneumoniae*) fijados a partículas de látex, de gelatina o de eritrocitos en el caso de la prueba de hemaglutinación indirecta (HAI). La técnica requiere al menos dos sueros para poner de manifiesto un aumento del título de anticuerpos y no presenta ventajas sobre la técnica de ELISA (Waites K.B., C.M. Bébéar, J.A. Robertson, D.F. Talkington, and G.E. Kenny. Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. Cumitech of American Society for Microbiology, coordinating editor: F.S. Nolte, 2001, ASM press: 1 – 30).
- 10 **[0019]** Las técnicas de ELISA permiten detectar las IgG o las IgM de forma independiente. Se han utilizado preparaciones de extractos bacterianos, de proteínas purificadas tales como la adhesina P1, de glucolípidos y de péptidos sintéticos, fijados a un soporte sólido. El suero de los pacientes se incubaba con la fase sólida antigénica, mientras que los anticuerpos anti-IgM o anti-IgG humanos conjugados con una enzima reaccionan con los anticuerpos unidos al antígeno. El complejo se revela a través de la hidrólisis de un sustrato de la enzima, lo que da lugar a un producto teñido. La elección de la técnica ELISA (IgM y/o IgG) depende de la edad del paciente y en el número de sueros que puedan ser analizados. La presencia de IgM es altamente indicativa en los niños y en los adolescentes, pero más rara vez se observa en los adultos. Es preferible detectar anticuerpos específicos en dos sueros tomados en un intervalo de entre 10 y 15 días con el fin de revelar una seroconversión (aumento x 4 del título de anticuerpos).
- 15 **[0020]** En resumen, las prácticas actuales no siempre cumplen las expectativas médicas de cara a establecer un diagnóstico definitivo de las infecciones por *M. pneumoniae* en niños o en adultos. A pesar de que las pruebas serológicas parecen ser los más adecuados, en muchos casos sigue siendo complicado diferenciar entre el diagnóstico de una infección activa y una infección pasada. Bébéar, J.A. Robertson, D.F. Talkington, and G.E. Kenny. Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. Cumitech of American Society for Microbiology, coordinating editor: F.S. Nolte., 2001, ASM press: 1 – 30, Talkington DF, Shott S, Fallon MT, Schwartz SB and Thacker WL. Analysis of eight commercial enzyme immunoassay tests for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2004).
- 20 **[0021]** La patente US5788962 describe el uso del polipéptido p65 o del polinucleótido que codifica para esta proteína con el fin de detectar, en muestras biológicas de origen no humano (solución que contiene las membranas de los micoplasmas), la presencia de los anticuerpos producidos después de una infección por *Mycoplasma pneumoniae*.
- 25 **[0022]** El documento SJOSTROM K E ET AL, vol. 33, no. 2, 1983, páginas 218 – 228, describe que las ATPasas presentan diferentes especificidades serológicas no solo de una especie a otra, sino también dentro de la misma especie. Así pues, las ATPasas de *M. pneumoniae* solo son reconocidas por los anticuerpos obtenidos a partir de *M. pneumoniae*. Sin embargo, la producción de anticuerpos se obtiene mediante una hiperinmunización de conejos, que es muy diferente de la infección humana natural.
- 30 **[0023]** La patente WO 96/28472 describe la subunidad b de FoFI-ATPasa y/o sus derivados, que se podrían utilizar como antígenos para las vacunas.
- 35 **[0024]** Los principales objetivos de la presente invención se centran en resolver las deficiencias de las pruebas serológicas actuales y en lograr un diagnóstico sensible y específico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. Dentro de este contexto, los inventores de la presente invención han identificado, a partir del genoma de *M. pneumoniae*, un polipéptido denominado 7F4, que corresponde a la subunidad beta de la ATPasa, con una secuencia polipeptídica ID SEQ N° 2, cuyos posibles usos, incluido entre ellos el indicado más abajo, se describen a continuación. La proteína 7F4 es una proteína de membrana expuesta en el citoplasma de la bacteria y que participa en la actividad metabólica de *M. pneumoniae*. También se encuentra en otros microorganismos, especialmente en otras especies de micoplasmas, tales como *M. hypopneumoniae*.
- 40 **[0025]** Las siguientes definiciones se incluyen con el fin de facilitar la comprensión de algunos términos utilizados en esta descripción.
- 45 **[0026]** Se entiende por «polinucleótido» un polirribonucleótido o un polidesoxirribonucleótido que puede ser un ADN o un ARN modificado o sin modificar.
- 50 **[0027]** El término polinucleótido incluye, sin limitación, un ADN Mono catenario o bicatenario, un ADN compuesto por una mezcla de una o más regiones monocatenarias y de una o más regiones bicatenarias, un ADN que es una mezcla de regiones monocatenarias, bicatenarias o tricatenarias, ARN monocatenario o bicatenario, un ARN compuesto por una mezcla de una o más regiones monocatenarias y de una o más regiones bicatenarias, y las moléculas híbridas que comprende un ADN y un ARN que pueden comprender regiones monocatenarias,

bicatenarias o tricatenarias o una mezcla de regiones monocatenarias y bicatenarias. El término polinucleótido también puede incluir un ARN y/o un ADN que comprende una o más regiones tricatenarias. Las cadenas de tales regiones pueden proceder de la misma molécula o de moléculas diferentes. En consecuencia, el término polinucleótidos incluye los ADN o los ARN que poseen cadenas principales modificadas por motivos de estabilidad, o por otras razones. También se entiende por polinucleótido los ADN y los ARN que contienen una o más bases modificadas. Se entiende por «base modificada», por ejemplo, las bases no habituales, tales como la inosina. El término polinucleótido también se refiere a los polinucleótidos con una forma modificada químicamente, enzimáticamente o metabólicamente. Los polinucleótidos también incluyen los polinucleótidos cortos, tales como los oligonucleótidos.

[0028] Se entiende por «polipéptido» un péptido, un oligopéptido, un oligómero o una proteína que comprende al menos dos aminoácidos unidos por un enlace peptídico normal o modificado.

[0029] El término polipéptido comprende las cadenas cortas, llamadas péptidos, oligopéptidos y oligómeros, y las cadenas largas, llamadas proteínas.

[0030] Un polipéptido puede estar compuesto por aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por los genes humanos. Un polipéptido puede también estar compuesto por aminoácidos modificados por procesos naturales, tales como el proceso de maduración postraduccional, o por procesos químicos, que son bien conocidos por el experto en la materia. El mismo tipo de modificación puede estar presente en varios lugares del polipéptido, sin importar en qué parte del polipéptido: en el esqueleto peptídico, en la cadena de aminoácidos o en los extremos carboxi- o amino-terminal.

[0031] Un polipéptido puede estar ramificado como consecuencia de una ubiquitinación o puede ser cíclico con o sin ramificación. Este tipo de modificación puede ser el resultado de procesos de postraducción naturales o sintéticos, que son bien conocidos por el experto en la materia.

[0032] Se entiende por modificaciones de un polipéptido, por ejemplo, la acetilación, la acilación, la ADP-ribosilación, la amidación, la unión covalente de flavina, la unión covalente de un grupo hemo, la unión covalente de un nucleótido o de un derivado de nucleótidos, la unión covalente de un lípido o de un derivado de lípidos, la unión covalente de un fosfatidilinositol, la reticulación covalente o no covalente, la ciclación, la formación de puentes disulfuro, la desmetilación, la formación de cisteína, la formación de piroglutamato, la formilación, la gamma-carboxilación, la glucosilación, la formación de anclaje a GPI, la hidroxilación, la yodación, la metilación, la miristoilación, la oxidación, el proceso proteolítico, la fosforilación, la prenilación, la racemización, la selenoilación, la sulfatación, la adición de aminoácidos, tales como la arginilación o la ubiquitinación. (PROTEINS STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, New York (1993) and Wold, F., Posttranslational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pg. 1 – 12 in POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182: 626 – 646 (1990) and Rattan et al., Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48 – 62 (1992)).

[0033] Se entiende por «aislado» modificado por la mano humana desde el estado natural, es decir, que el polinucleótido o el polipéptido presente en la naturaleza ha sido modificado o aislado de su entorno natural, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de forma natural en un organismo vivo no está «aislado», pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes en su estado natural está «aislado».

[0034] Se entiende por «porcentaje de similitud» entre dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas el porcentaje de nucleótidos o aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias comparadas, que se obtiene a partir de la mejor alineación, siendo ese porcentaje puramente estadístico y encontrándose las diferencias entre las dos secuencias distribuidas al azar por toda su longitud. Las comparaciones entre dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas se realizan de forma convencional mediante la comparación de las secuencias una vez alineadas de forma óptima, llevándose a cabo la citada comparación por segmentos o por «ventanas de comparación» con el fin de identificar y comparar las regiones locales que posean similitud de secuencias. Esta comparación se puede realizar mediante un programa, por ejemplo el programa EM2 BOSS-Needle (alineamiento global Needleman-Wunsch) con ayuda de la matriz BLOSUM62/Open Gap 10.0 y una Extension Penalty de 0,5 (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. (1970), J. Mol. Biol. 48, 443 – 453 et Kruskal, J.B. (1983), An overview of sequence comparison, In D. Sankoff and J.B. Kruskal, (ed), Time warps, strind edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, pp. 1 – 44 Addison Wesley).

[0035] El porcentaje de similitud se calcula determinando el número de posiciones idénticas para las que el nucleótido o el aminoácido es idéntico entre las dos secuencias, dividiendo este número de posiciones idénticas entre el número total de posiciones de la ventana de comparación, y multiplicando por 100 el resultado obtenido.

5 [0036] Un polipéptido que presente, por ejemplo, una similitud de al menos el 95 % con el polipéptido ID SEQ N.º 2 es un polipéptido que comprende, a lo sumo, 5 aminoácidos modificados por cada 100 aminoácidos, con relación a la citada secuencia. En otras palabras, hasta el 5 % de los aminoácidos de la secuencia ID SEQ N.º 2 pueden haber sido eliminados o sustituidos por un aminoácido diferente o la secuencia puede comprender hasta un 5 % de aminoácidos adicionales con respecto al número total de aminoácidos presentes en la secuencia ID SEQ N.º 2. Estas alteraciones de la secuencia pueden estar situadas en las posiciones amino- y/o carboxi-terminales de la secuencia de aminoácidos o en cualquier sitio entre estas posiciones terminales, en una o más ubicaciones. (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987) .

15 [0037] Por analogía, un polinucleótido que presente, por ejemplo, una similitud de al menos el 95 % con el polinucleótido ID SEQ N.º 2 es pues un polinucleótido que comprende, a lo sumo, 5 nucleótidos modificados por cada 100 nucleótidos, con relación al citado polinucleótido. En otras palabras, hasta el 5 % de los nucleótidos del polinucleótido ID SEQ N.º 1 pueden haber sido eliminados o sustituidos por un nucleótido diferente o el polinucleótido puede comprender hasta un 5 % de nucleótidos adicionales con respecto al número total de nucleótidos presentes en el polinucleótido ID SEQ N.º 1. Estas modificaciones pueden estar situadas en los extremos 3' y/o 5', o en cualquier sitio entre estos extremos, en una o más ubicaciones.

20 [0038] Se entiende por «fragmento de polipéptido» un polipéptido que comprende por lo menos «n» aminoácidos consecutivos procedentes del polipéptido ID SEQ N.º 1, en el que, en función de las secuencias, n será igual a 7 aminoácidos o más (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50 o más aminoácidos). Preferiblemente, los citados fragmentos comprenden un epítipo de la secuencia ID SEQ N.º 2. Estos epítipos de tipo B o T pueden ser determinados mediante un programa de software (por ejemplo PEOPLE [Alix, 1999], PREDITOP [Pellequer et Westhof, 1993] o TEST [Zao et al., 2001]) o de forma experimental mediante técnicas convencionales (por ejemplo, cartografía de epítipos o proteólisis suave).

25 [0039] Se entiende por «fragmento de la secuencia del polinucleótido» un polinucleótido que comprende por lo menos «n» nucleótidos consecutivos procedentes del polinucleótido ID SEQ N.º 1, en el que, en función de las secuencias, n será igual a 21 nucleótidos o más (por ejemplo, 22, 23, 24, 25, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 90, 120, 150 o más nucleótidos).

30 [0040] Se entiende por «célula huésped» una célula que ha sido transformada o transfectada, o que es capaz de ser transformada o transfectada, por una secuencia polinucleotídica exógena.

35 [0041] Se entiende por «cebadores específicos» secuencias cortas de nucleótidos capaces de hibridarse específicamente, gracias a la complementariedad de las bases, sobre la cadena de ADN o sobre su cadena complementaria.

40 [0042] Se entiende por «medio de cultivo» el medio en el que se purifica el polipéptido de la invención. Este medio puede estar constituido por el medio extracelular y/o el lisado celular. Existen técnicas bien conocidas por el experto en la materia que también permiten devolver al polipéptido la conformación activa si la conformación del citado péptido ha sido modificada durante el aislamiento o la purificación.

45 [0043] Se entiende por «función» la actividad biológica de un polipéptido o de un polinucleótido. La función de un polipéptido según la invención es la de antígeno de *M. pneumoniae*, y la función de un polinucleótido según la invención es la de codificar para ese polipéptido.

50 [0044] Se entiende por «antígeno» cualquier compuesto que, por sí solo o en asociación con un adyuvante o vehículo, es capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica. Esta definición también incluye cualquier compuesto que posea analogía estructural con el citado antígeno capaz de inducir una respuesta inmunológica dirigida contra el citado antígeno.

55 [0045] Se entiende por «analogía estructural» una analogía tanto de la estructura primaria (secuencia) como de la estructura secundaria (elementos estructurales), de la estructura terciaria (estructura tridimensional) o de la estructura cuaternaria (asociación de varios polipéptidos en un solo complejo) (BIOCHEMISTRY, 4ème Ed, L. Stryer, New York, 1995).

60 [0046] Se entiende por «variante» de un polinucleótido denominado inicial o de un polipéptido denominado inicial, respectivamente, un polinucleótido o polipéptido que difiere de los anteriores por lo menos en un nucleótido o aminoácido, pero que conserva la misma las propiedades intrínsecas, es decir, la misma función.

[0047] Una diferencia en la secuencia polinucleotídica de la variante puede o no alterar la secuencia de

aminoácidos del polipéptido que codifica, con relación a un polipéptido inicial. No obstante, por definición, estas variantes debe conferir la misma función que la secuencia polinucleotídica inicial, por ejemplo, debe codificar para un polipéptido que posea una función antigénica.

5 **[0048]** La variante del polinucleótido o del polipéptido generalmente difiere del polinucleótido inicial o del polipéptido inicial en una (o más) sustitución(es), adición(es), eliminación(es), fusión(es) o truncamiento(s), o una pluralidad de las citadas modificaciones, tomadas en combinación. Una variante no natural de un polinucleótido inicial o de un polipéptido inicial se puede obtener, por ejemplo, por mutagénesis dirigida o por síntesis directa.

10 **[0049]** Se define una «secuencia polinucleotídica complementaria de la secuencia polinucleotídica» como un polinucleótido que se puede hibridar con la secuencia polinucleotídica en condiciones estrictas.

[0050] En términos generales, pero no necesariamente, se entiende por «condiciones estrictas» las condiciones químicas que permiten una hibridación cuando las secuencias polinucleotídicas presentan una similitud de al menos el 80 %. Estas condiciones pueden ser obtenidas mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia.

15 **[0051]** Se entiende por «anticuerpo» los anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, de cadena simple, humanizados, así como los fragmentos Fab, incluidos los productos de un Fab o de una biblioteca de expresión de inmunoglobulinas.

20 **[0052]** Un anticuerpo inmunoespecífico puede ser obtenido mediante la administración a un animal de un polipéptido dado y, a continuación, recuperando los anticuerpos producidos por el citado animal por extracción de sus líquidos corporales. También es posible administrar al animal una variante del citado polipéptido o células huésped que expresan este polipéptido.

25 **[0053]** El término «inmunoespecífico» aplicado al término anticuerpo, con respecto a un polipéptido dado, significa que el anticuerpo posee una afinidad mayor por este polipéptido que por otros polipéptidos conocidos en la técnica anterior.

30 **[0054]** Se entiende por «afinidad» la concurrencia de una complementariedad estructural y de una complementariedad de uniones de baja energía entre dos moléculas, en el sentido de una definición comúnmente aceptada (véase, por ejemplo, Klotz IM. Ligandprotein binding affinities. In Protein Function, a Practical Approach (T. E. Creighton, Ed.). 1989; 25 – 35. IRL Press, Oxford, o también Ajay, Murcko MA. Computational methods to predict binding free energy in ligand-receptor complexes. J Med 4 Chem. 1995; 38:4953 – 67). La afinidad puede ser medida mediante las técnicas convencionales de la bioquímica (ELISA, competencia, fluorescencia, etc.) bien conocidas por el experto en la materia.

35 **[0055]** Se entiende por suero «positivo» un suero que contiene anticuerpos, producidos después de una infección por *M. pneumoniae*, identificados por su unión con el polipéptido (antígeno) de la invención.

40 **[0056]** Se entiende por «sensibilidad» la proporción de pacientes infectados, diagnosticados de acuerdo con la técnica anterior y con resultado positivo por el diagnóstico según la invención.

45 **[0057]** Se entiende por «especificidad» la proporción de donantes de sangre, analizados como controles, sometidos al diagnóstico según la invención y con resultado negativo por el diagnóstico según la invención.

[0058] Se entiende por «kit de diagnóstico» un conjunto que contiene al menos uno de los productos según la invención (polipéptido, polinucleótido) y un diluyente adecuado, combinados en un recipiente apropiado hecho de un material adecuado. Este recipiente puede contener los diversos medios complementarios necesarios para la prueba serológica (por ejemplo, reactivos marcados, tampones, soluciones que contengan los iones adecuados, etc.), así como las instrucciones requeridas para llevar a cabo la prueba.

50 **[0059]** Como se ha indicado anteriormente, la invención se refiere al uso, en el campo del diagnóstico *in vitro* de las infecciones por *M. pneumoniae* y/o en la producción de vacunas contra *M. pneumoniae*, de polipéptidos según la invención, de polinucleótidos que codifican para los citados polipéptidos, de vectores de expresión que comprenden los citados polinucleótidos, de células huésped que comprenden los citados vectores de expresión.

Uso de polipéptidos

60 **[0060]** La identificación del polipéptido según la invención es el resultado de un cribado y de estudios en profundidad que no podría preverse a partir de las secuencias obtenidas mediante los programas genómicos de *M. pneumoniae*.

[0061] Así pues, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido aislado que comprende la secuencia de

aminoácidos ID SEQ N.º 2 (llamada proteína 7F4), codificada por la secuencia polinucleotídica ID SEQ N.º 1, con el fin de detectar, *in vitro*, en muestras biológicas tomadas de un ser humano, la presencia de anticuerpos producidos después de una infección por *Mycoplasma pneumoniae*. La presente invención se refiere asimismo al uso de un polipéptido aislado que comprende:

- 5
- a) un fragmento de la secuencia de aminoácidos ID SEQ N.º 2 que presenta la misma función que la secuencia ID SEQ N.º 2, o bien
- b) una secuencia de aminoácidos que presenta una similitud de al menos el 60 %, preferentemente una similitud de al menos el 80 %, y más preferiblemente una similitud de al menos el 90 %, con la secuencia de aminoácidos ID SEQ N.º 2 o con el fragmento de la secuencia definida en a), y que posee la misma función que la secuencia ID SEQ N.º 2, teniendo en cuenta que:
- 10 por «fragmento de la secuencia de aminoácidos» se entiende un polipéptido que comprende por lo menos «n» aminoácidos consecutivos procedentes del polipéptido ID SEQ N.º 2, en el que, en función de las secuencias, n será igual a 7 aminoácidos o más, y
- 15 por «que posee la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 2» se entiende una función de antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*.

[0062] La presente invención se refiere también a un procedimiento para la preparación de un polipéptido, tal y como se ha definido anteriormente, en el que se cultiva una célula huésped definida anteriormente y el citado polipéptido se aísla del medio de cultivo.

20

[0063] El polipéptido puede ser purificado a partir de las células huésped, de acuerdo con procedimientos conocidos por el experto en la materia, tales como la precipitación con ayuda de agentes caotrópicos tales como sales, en particular, el sulfato de amonio, el etanol, la acetona o el ácido tricloroacético, o por medios tales como la extracción con ácido, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía sobre fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía de afinidad, la cromatografía sobre hidroxilapatito o las cromatografías de exclusión.

25

30 Uso de polinucleótidos

[0064] La presente invención se refiere en particular al uso con el fin de detectar *in vitro*, en muestras biológicas tomadas de un ser humano, la presencia de anticuerpos producidos después de una infección por *Mycoplasma pneumoniae*, de un polinucleótido aislado que comprende la secuencia polinucleotídica ID SEQ N.º 1 que codifica para el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos ID SEQ N.º 2. La invención se refiere asimismo al uso de un polinucleótido aislado que comprende:

35

- a) un fragmento de la secuencia ID SEQ N.º 1 que presenta la misma función que la secuencia ID SEQ N.º 1, o bien
- 40 b) una secuencia polinucleotídica que presenta una similitud de al menos el 60 %, preferentemente una similitud de al menos el 80 %, y más preferiblemente una similitud de al menos el 90 %, con la secuencia polinucleotídica ID SEQ N.º 1 o con el fragmento de la secuencia tal como la definida en a), y que posee la misma función que la secuencia ID SEQ N.º 1, o bien
- c) una secuencia polinucleotídica complementaria a la secuencia polinucleotídica ID SEQ N.º 1 o al fragmento de secuencia definido en a) o a la secuencia definida en b), teniendo en cuenta que:
- 45 por «fragmento de la secuencia del polinucleótido» se entiende un polinucleótido que comprende por lo menos «n» nucleótidos consecutivos procedentes del polinucleótido ID SEQ N.º 1, en el que, en función de las secuencias, n será igual a 21 nucleótidos o más, y
- 50 por «que posee la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 1» se entiende una función de codificación de un polipéptido antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*.

[0065] En consecuencia, los polinucleótidos según la invención puede comprender variantes o fragmentos de la secuencia polinucleotídica ID SEQ N.º 1.

[0066] Los polinucleótidos de la invención puede ser obtenidos mediante los procedimientos estándar de síntesis de ADN o de ARN.

55

[0067] Los polinucleótidos según la invención también puede comprender secuencias polinucleotídicas tales como las secuencias 5' y/o 3' no codificantes, tales como, por ejemplo, secuencias transcritas, secuencias no traducidas, secuencias de señal de empalme, secuencias poliadeniladas, secuencias de unión a ribosomas o secuencias de estabilización del ARNm.

60

Uso de vectores de expresión y de células huésped

5 [0068] La presente invención también tiene como objetivo el uso del polipéptido según la invención preparado mediante el cultivo de una célula huésped que comprende un vector recombinante que posee, insertado, un polinucleótido que codifica para el citado polipéptido según la invención.

10 [0069] Es posible utilizar numerosos sistemas de expresión, tales como, por ejemplo, los cromosomas, los episomas, los derivados de virus. Más particularmente, los vectores recombinantes utilizados pueden ser derivados de plásmidos bacterianos, transposones, episomas de levadura, elementos de inserción, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como los *baculovirus*, los *virus del papiloma* tales como SV40, los *virus vaccinia*, los adenovirus, los *virus de viruela*, los *virus de la pseudorabia*, los retrovirus.

15 [0070] Estos vectores recombinantes pueden también ser derivados de cósmidos o de fagómidos. La secuencia polinucleotídica puede ser insertada en el vector recombinante de expresión mediante procedimientos bien conocidos por el experto en la materia.

20 [0071] El vector recombinante puede comprender secuencias polinucleotídicas para controlar la regulación de la expresión del polinucleótido, así como secuencias polinucleotídicas que permitan la expresión y la transcripción de un polinucleótido de la invención y la traducción de un polipéptido de la invención, eligiéndose las secuencias en función de las células huésped utilizadas.

25 [0072] La introducción del vector recombinante en una célula huésped puede llevarse a cabo según procedimientos bien conocidos por el experto en la materia, tales como la transfección con fosfato cálcico, la transfección con lípidos catiónicos, la electroporación, la transducción o la infección.

30 [0073] Las células huésped pueden ser, por ejemplo, células bacterianas tales como células de estreptococos, de estafilococos, de *Escherichia coli* o de *Bacillus subtilis*, células fúngicas tales como células de levadura y células de *Aspergillus*, células de *Streptomyces*, células de insectos tales como células de *Drosophila S2* y de *Spodoptera Sf9*, células animales, tales como CHO, COS, HeLa, C127, BHK, HEK 293 o células vegetales.

35 [0074] El polipéptido puede ser purificado a partir de las células huésped, de acuerdo con procedimientos conocidos por el experto en la materia, tales como la precipitación con ayuda de agentes caotrópicos tales como sales, en particular, el sulfato de amonio, el etanol, la acetona o el ácido tricloroacético, o por medios tales como la extracción con ácido, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía sobre fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía de afinidad, la cromatografía sobre hidroxilapatito o las cromatografías de exclusión.

Serología

40 [0075] Las muestras biológicas analizadas pueden ser de sangre, de orina, de saliva, de líquido de punción serológica (por ejemplo, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural o líquido articular), o de uno de sus constituyentes (por ejemplo, el suero).

Las vacunas

45 [0076] La presente invención se refiere también a una vacuna para la prevención de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae* en los seres humanos.

50 [0077] y que comprende como principio activo al menos uno de los polipéptidos de los polinucleótidos según la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, una solución estéril acuosa o no, que puede contener un antioxidante o un tampón o un soluto que haga que la composición sea isotónica para los líquidos corporales).

Los kits

55 [0078] La invención se refiere también a kits de diagnóstico *in vitro* que comprenden, por un lado:

- por lo menos uno de los polipéptidos según la invención, o
 - por lo menos uno de los polinucleótidos que codifican para los citados polipéptidos,
- y, por otro lado, al menos un diluyente (por ejemplo un tampón, una solución salina, etc.) y unas instrucciones de uso.
- 60

Parte experimentalA) Protocolo para la obtención de antígenos5 A.1) Clonación de la secuencia que codifica para el polipéptido ID SEQ N.º 2

[0079] El gen que codifica para la secuencia del polipéptido 7F4 según la invención, que es un antígeno, se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir del ADN genómico de la bacteria *M. pneumoniae* (cepa M129-B7, ATCC 29342) utilizando como par cebador:

10 el oligonucleótido sentido que contiene la secuencia:

5'-AAAAAGGAAAACATTACATACG -3'; y

el oligonucleótido antisentido que contiene la secuencia:

15 5'TTTCTCCTCAACAGTAG-3'.

[0080] El fragmento correspondiente, amplificado de este modo, se clonó en un vector mediante las técnicas convencionales bien conocidas por el experto en la materia. Este vector permite la producción de la proteína clonada bajo el control de un promotor inducible por el isopropil tiogalactósido (abreviatura IPTG). La proteína clonada corresponde a la secuencia de aminoácidos ID SEQ N.º 2.

20 A.2) Expresión de la proteína

[0081] Se transformó una cepa de *Escherichia coli* con el vector de expresión descrito anteriormente. Las bacterias seleccionadas se cultivaron durante la noche a 30 °C, con agitación, en 50 ml de medio Luria Bertani (LB, J. Miller, "A short course in Bacteria Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992) que contiene ampicilina y cloranfenicol, ambos en una concentración final de 100 µg/ml. Al día siguiente, el cultivo se diluyó 1/50 en un volumen final de 1 litro de medio LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol, ambos en una concentración final de 100 µg/ml, y se incubó a 30 °C, con agitación. Cuando la turbidez del cultivo alcanzó un valor de absorbancia a 600 nm (abreviatura A600) de aproximadamente 0,7, la producción de la proteína se indujo mediante isopropil tiogalactósido (IPTG) hasta una concentración final de 0,5 mM. Las bacterias se recogieron por centrifugación (6 minutos a 5240 rpm a 4 °C) cuando la turbidez del cultivo alcanzó una A600 de aproximadamente 1,5.

30 A.3) Purificación

[0082] Después de la centrifugación, las células se resuspendieron en un tampón Tris-HCl 20 mM de pH 8 que contiene sacarosa 0,5 mM, y después se trataron con lisozima (0,1 g/50 ml) en presencia de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 250 mM. La suspensión se incubó durante 30 minutos a 4 °C y luego se centrifugó durante 10 minutos a 4 °C a 15.500 g. El sedimento se congeló a -20 °C durante al menos una noche.

[0083] Después de la descongelación, las bacterias se recogieron en un tampón Mes [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico] 25 mM de pH 6,0 y luego se sonicaron 4 veces durante 20 segundos en hielo. Tras la centrifugación a 15.500 g a 4 °C durante 30 minutos, el sedimento se recogió en 10 ml de tampón Mes 25 mM de pH 6,0, urea 8 M, β mercaptoetanol 20 mM. A continuación, la suspensión se centrifugó durante 20 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente (TA). El sobrenadante se centrifugó de nuevo durante 30 minutos a TA a 14.000 rpm y, seguidamente, se filtró sobre una membrana porosa de 0,22 µm. Tras ello, el filtrado se depositó en una columna de intercambio catiónico (por ejemplo SP-Sépharose de 12 ml, Amersham Biosciences). Después de lavar la columna, la proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 1 M de NaCl en tampón Mes 25 mM de pH 6,0, urea 8 M, β mercaptoetanol 20 mM en 20 volúmenes de columna. Las fracciones que contenían la proteína se recogieron, se dializaron durante la noche contra un tampón Mes 25 mM de pH 6,0, urea 8 M, β mercaptoetanol 20 mM y, seguidamente, se depositaron de nuevo en la misma columna. Después la proteína se eluyó con un nuevo gradiente de NaCl optimizado para la proteína 7F4. Las fracciones elegidas que contenían la proteína se recogieron y se dializaron durante la noche contra un tampón de Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM de pH 8,0 que contenía NaCl 100 mM, y luego se depositaron en una columna de filtración en gel (por ejemplo Superdex HR75-10/30, Amersham). Las fracciones eluidas que contenían la proteína se recogieron y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso en las pruebas.

[0084] Las concentraciones de proteína se determinaron a partir de los coeficientes de absorción molar calculados por el procedimiento de Pace (Pace CN, Vajdos F., Fee L., Grismley G. et Gray T., (1995), Protein Science 4, 2411 – 2423). La pureza de las proteínas se comprobó mediante un análisis electroforético SDS-PAGE.

60 B) Prueba de diagnóstico *in vitro*

[0085] Se han utilizado sueros obtenidos de pacientes niños y adultos que han sufrido una infección documentada por *M. pneumoniae* (obtención de laboratorio, es decir, título de IgM y/o IgG y/o RFC positivos y/o PCR positiva y/o

cultivo positivo).

[0086] Los sueros de control corresponden a los sueros de donantes de sangre (obtención de laboratorio).

5 **[0087]** La fijación, sobre la proteína recombinante purificada 7F4 (obtenida tal como se ha descrito anteriormente), de los anticuerpos presentes en los sueros se evaluó mediante pruebas de Western Blot o por la técnica ELISA.

Ejemplo B.1: Protocolo de prueba por Western Blot para los polipéptidos según la invención

10 **[0088]** Después de la transferencia de la proteína purificada 7F4 a una membrana de nitrocelulosa, la membrana se saturó durante 45 minutos con la ayuda de un tampón fosfato salino (PBS) que contenía un 3 % de leche semidesnatada. Después de lavar tres veces con PBS que contenía polioxietileno sorbitán (Tween) al 0,05 %, la membrana se expuso al suero analizado a la dilución apropiada (1/500) en tampón de PBS que contenía un 3 % de leche semidesnatada durante 45 minutos. Después de lavar tres veces más, se añadieron anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas G, A y M humanas (por ejemplo 170 – 1042, Biorad), marcados con fosfatasa alcalina, durante un período de 45 minutos después de ser diluidos, según el protocolo del proveedor, en tampón de PBS que contenía un 3 % de leche semidesnatada. Se llevaron a cabo tres nuevos lavados y, seguidamente, se añadieron fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo y nitroazul de tetrazolio de acuerdo con las instrucciones del proveedor hasta que se obtuvo el resultado. Un resultado «positivo» corresponde a la fijación del anticuerpo de anti-inmunoglobulina humana a un complejo formado por el polipéptido según la invención fijado a la membrana y por el anticuerpo sérico humano que lo reconoce específicamente, que se manifiesta por una tinción local del citado complejo.

Ejemplo B.2: Protocolo de prueba ELISA

25 **[0089]** Las placas ELISA se dejaron durante la noche a temperatura ambiente en presencia de 0,5 µg de antígeno purificado (proteína recombinante 7F4) en tampón fosfato salino (PBS) urea 6 M. Después de lavar cuatro veces con PBS que contenía polioxietileno sorbitán (Tween) al 0,05 %, las placas se saturaron durante una hora y media a 37 °C con PBS-Tween que contenía un 4 % de albúmina sérica bovina (BSA) (250 µl por pocillo). Se llevaron a cabo otros cuatro lavados y, seguidamente, se añadieron a cada pocillo 100 µl de cada suero a analizar, con una dilución 1/100 en tampón PBS-BSA al 4 %. La placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de lavar cuatro veces más, se añadieron (de forma simultánea y/o de forma independiente) anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas G y/o A y/o M humanas marcadas con peroxidasa (por ejemplo 31415, Pierce) durante 30 minutos a 37 °C, después de ser diluidos, según el protocolo del proveedor, en tampón PBS-BSA al 4 %. Se realizaron cuatro nuevos lavados y, seguidamente, se añadieron a cada pocillo 100 µl de tetrabencimidina (TMB) (por ejemplo, HD979505, Pierce). Después de la incubación durante aproximadamente 15 minutos, se añadieron a cada pocillo 100 µl de ácido sulfúrico. A continuación se midió la absorbancia a 450 nm de cada pocillo después de 5 minutos.

[0090] Los sueros identificados por su unión a los polipéptidos (antígenos) de la invención se consideran «positivos» en la prueba ELISA.

40

C) Resultados e interpretaciones

[0091] En la tabla siguiente se presenta un resultado típico obtenido. Los sueros de los pacientes (niños y/o adultos) que se consideran positivos son aquellos que contienen anticuerpos dirigidos contra *M. pneumoniae*, identificados por ELISA por su unión a los polipéptidos (antígenos) de la invención.

45

[0092] Tabla de resultados (ELISA) obtenidos en pacientes adultos y/o niños utilizando anti-IgM como anticuerpos secundarios

El número de sueros «positivos» entre los 62 sueros de pacientes (niños y adultos) infectados por <i>M. pneumoniae</i> diagnosticados de acuerdo con la técnica anterior y sometidos al diagnóstico según la invención	32 (es decir, 51,6 %)
El número de sueros «positivos» entre los 34 sueros de pacientes niños infectados por <i>M. pneumoniae</i> diagnosticados de acuerdo con la técnica anterior y sometidos al diagnóstico según la invención	24 (es decir, 70,6 %)
El número de sueros «positivos» entre los 28 sueros de pacientes adultos infectados por <i>M. pneumoniae</i> diagnosticados de acuerdo con la técnica anterior y sometidos al diagnóstico según la invención	8 (es decir, 28,5 %)
Número de sueros «positivos» entre los 96 sueros de donantes de sangre de control	92 (es decir, 95,8 %)

50

[0093] También pueden obtenerse resultados significativos utilizando anticuerpos anti-IgA como anticuerpos secundarios. Asimismo, pueden obtenerse resultados similares mediante Western Blot

[0094] De acuerdo con la tabla de resultados, se observa que, mediante la prueba de ELISA, es posible identificar

in vitro por lo menos el 51,6 % de las infecciones por *M. pneumoniae* independientemente de la edad del paciente, por lo menos el 70,6 % de las infecciones por *M. pneumoniae* en pacientes niños y por lo menos el 28,5 % de las infecciones por *M. pneumoniae* en pacientes adultos por medio del antígeno según la invención.

- 5 **[0095]** Por consiguiente, se muestra, por un lado, que en los seres humanos aparece una respuesta de anticuerpos significativa (la probabilidad asociada con una prueba de χ^2 es menor que 0,05) con respecto a la proteína 7F4 durante las infecciones por *M. pneumoniae* y, por otro lado, que la proteína 7F4 es pertinente para el diagnóstico serológico de este tipo de infecciones, en particular en niños.
- 10 **[0096]** Se constata una alta concentración de anticuerpos anti-7F4 en la mayoría de los niños evaluados. Por consiguiente, este antígeno puede conferir a los individuos infectados una protección inmunitaria prolongada contra la reinfección. Así pues, el antígeno 7F4 podría ser utilizado para la vacunación contra las infecciones por *M. pneumoniae*.

15 LISTA DE SECUENCIAS

[0097]

< 110 > ABAG
 Université Victor Segalen Bordeaux 2

20 < 120 > Uso de la proteína 7F4 en el diagnóstico *in vitro* de infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*

< 130 > B4325

25 < 150 > FR0608734
 < 151 > 2006-10-05

< 160 > 2

30 < 170 > PatentIn version 3.3

< 210 > 1
 < 211 > 1422
 < 212 > DNA

35 < 213 > *Mycoplasma pneumoniae*

< 220 >
 < 221 > CDS
 < 222 > (1) .. (1422)

40 < 400 > 1

ES 2 388 884 T3

aaa aag gaa aac att aca tac ggt aag gtc cac caa gtg att ggc ccg Lys Lys Glu Asn Ile Thr Tyr Gly Lys Val His Gln Val Ile Gly Pro 1 5 10 15	48
gta gtt gat gtc atc ttt acg gaa agt agt cag tta ccc cgc att tac Val Val Asp Val Ile Phe Thr Glu Ser Ser Gln Leu Pro Arg Ile Tyr 20 25 30	96
gat tgt ttg agt gtt aag tta gct ggg gaa gaa ctg ttt ttg gaa gcc Asp Cys Leu Ser Val Lys Leu Ala Gly Glu Glu Leu Phe Leu Glu Ala 35 40 45	144
gcg cag cta ata ggc gat gac att gtg cgc tgc att gct ttg ggt cca Ala Gln Leu Ile Gly Asp Asp Ile Val Arg Cys Ile Ala Leu Gly Pro 50 55 60	192
act gaa ggg tta gca cgc aac gaa aag gtg act aac tat aac cac ccg Thr Glu Gly Leu Ala Arg Asn Glu Lys Val Thr Asn Tyr Asn His Pro 65 70 75 80	240
att gaa gtc cca gtt ggc aaa aac gtc ttg ggc cgg atg ttt aat gtt Ile Glu Val Pro Val Gly Lys Asn Val Leu Gly Arg Met Phe Asn Val 85 90 95	288
ttg ggt aaa ccc att gac ggg aag gag gag tta ccc aaa aaa cca caa Leu Gly Lys Pro Ile Asp Gly Lys Glu Glu Leu Pro Lys Lys Pro Gln 100 105 110	336
ctc ccg att cac cgc aaa cca cct tcg ttt gat gac cag tcc aat acg Leu Pro Ile His Arg Lys Pro Pro Ser Phe Asp Asp Gln Ser Asn Thr 115 120 125	384

ES 2 388 884 T3

cta gaa atc ttt gaa aca ggg att aag gtg att gac ttg ctc act ccc	432
Leu Glu Ile Phe Glu Thr Gly Ile Lys Val Ile Asp Leu Leu Thr Pro	
130 135 140	
tat gcc cgt ggt ggt aag att ggt tta ttt ggt ggt gct ggt gtt ggt	480
Tyr Ala Arg Gly Gly Lys Ile Gly Leu Phe Gly Gly Ala Gly Val Gly	
145 150 155 160	
aaa acg gtt tta gtg caa gag tta atc cac aac att gct aag gaa cac	528
Lys Thr Val Leu Val Gln Glu Leu Ile His Asn Ile Ala Lys Glu His	
165 170 175	
tct ggt tta agt gtg ttt gct ggt gtg ggg gaa cgc acc cgg gaa ggt	576
Ser Gly Leu Ser Val Phe Ala Gly Val Gly Glu Arg Thr Arg Glu Gly	
180 185 190	
aat gat ctc tac tat gaa atg atc cag ggt ggg gtg att gac aaa act	624
Asn Asp Leu Tyr Tyr Glu Met Ile Gln Gly Gly Val Ile Asp Lys Thr	
195 200 205	
gct tta gtg ttt ggt cag atg aac gaa ccc cca gga gca cgg atg cgg	672
Ala Leu Val Phe Gly Gln Met Asn Glu Pro Pro Gly Ala Arg Met Arg	
210 215 220	
gtc gct tta acg gcg ctt act atg gcc gaa tac ttc cgt gac cat gac	720
Val Ala Leu Thr Ala Leu Thr Met Ala Glu Tyr Phe Arg Asp His Asp	
225 230 235 240	
aac cag gat gtc ttg ctc ttc att gac aac atc ttc cgt ttt acc caa	768
Asn Gln Asp Val Leu Leu Phe Ile Asp Asn Ile Phe Arg Phe Thr Gln	
245 250 255	
gct ggt agt gag gta tca gca ctg tta ggt cgg atg cca tca gcc gtg	816
Ala Gly Ser Glu Val Ser Ala Leu Leu Gly Arg Met Pro Ser Ala Val	
260 265 270	
ggt tac caa cca acg ttg gcg act gaa atg ggg caa tta caa gag cgg	864
Gly Tyr Gln Pro Thr Leu Ala Thr Glu Met Gly Gln Leu Gln Glu Arg	
275 280 285	
att gct tcc act aaa acc ggt tcg att acc tcg gtg caa gcg atc tat	912
Ile Ala Ser Thr Lys Thr Gly Ser Ile Thr Ser Val Gln Ala Ile Tyr	
290 295 300	
gtg cca gct gat gac ttg act gac ccc gct ccg gct acc acc ttt acc	960
Val Pro Ala Asp Asp Leu Thr Asp Pro Ala Pro Ala Thr Thr Phe Thr	
305 310 315 320	
cac ctg gat gct aaa acg gtg tta gac cgg aac ata gca gcg ttg gga	1008
His Leu Asp Ala Lys Thr Val Leu Asp Arg Asn Ile Ala Ala Leu Gly	
325 330 335	
att ttt cca gcg atc aat ccc tta gag tct acc agt cgc tta ttg gat	1056
Ile Phe Pro Ala Ile Asn Pro Leu Glu Ser Thr Ser Arg Leu Leu Asp	
340 345 350	
cct aat att gtc ggg att aac cac tat aag gta gcg tta ggg gtg caa	1104
Pro Asn Ile Val Gly Ile Asn His Tyr Lys Val Ala Leu Gly Val Gln	
355 360 365	

ES 2 388 884 T3

aac atc tta cag cgc ttt gcg gaa cta caa gac att att gcc atc ttg	1152
Asn Ile Leu Gln Arg Phe Ala Glu Leu Gln Asp Ile Ile Ala Ile Leu	
370 375 380	
gga att gat gag tta gcg gat gag gac aag atc att gtg gaa cgg gca	1200
Gly Ile Asp Glu Leu Ala Asp Glu Asp Lys Ile Ile Val Glu Arg Ala	
385 390 395 400	
cgc cgg atc cgc aac ttc ctc tcc caa ccg ttc ttt gta gcg gaa aag	1248
Arg Arg Ile Arg Asn Phe Leu Ser Gln Pro Phe Phe Val Ala Glu Lys	
405 410 415	
ttc tcg ggg att gct ggg aag tat gtc cct tta agt gac acg atc caa	1296
Phe Ser Gly Ile Ala Gly Lys Tyr Val Pro Leu Ser Asp Thr Ile Gln	
420 425 430	
tcg ttt aag gaa atc ttg gac ggt aag cat gat gat ctc ccc gaa cag	1344
Ser Phe Lys Glu Ile Leu Asp Gly Lys His Asp Asp Leu Pro Glu Gln	
435 440 445	
gcc ttc ttc ttt gtt ggt acc att cag gaa gca gtg gag aaa gcg aag	1392
Ala Phe Phe Phe Val Gly Thr Ile Gln Glu Ala Val Glu Lys Ala Lys	
450 455 460	
cgg ctt aaa aaa gct act gtt gag gag aaa	1422
Arg Leu Lys Lys Ala Thr Val Glu Glu Lys	
465 470	

ES 2 388 884 T3

< 210 > 1
< 211 > 1422
< 212 > DNA
< 213 > *Mycoplasma pneumoniae*

5

< 400 > 1

```
Lys Lys Glu Asn Ile Thr Tyr Gly Lys Val His Gln Val Ile Gly Pro
1          5          10          15

Val Val Asp Val Ile Phe Thr Glu Ser Ser Gln Leu Pro Arg Ile Tyr
          20          25          30

Asp Cys Leu Ser Val Lys Leu Ala Gly Glu Glu Leu Phe Leu Glu Ala
          35          40          45

Ala Gln Leu Ile Gly Asp Asp Ile Val Arg Cys Ile Ala Leu Gly Pro
          50          55          60

Thr Glu Gly Leu Ala Arg Asn Glu Lys Val Thr Asn Tyr Asn His Pro
65          70          75          80

Ile Glu Val Pro Val Gly Lys Asn Val Leu Gly Arg Met Phe Asn Val
          85          90          95
```


ES 2 388 884 T3

Leu Gly Lys Pro Ile Asp Gly Lys Glu Glu Leu Pro Lys Lys Pro Gln
100 105 110

Leu Pro Ile His Arg Lys Pro Pro Ser Phe Asp Asp Gln Ser Asn Thr
115 120 125

Leu Glu Ile Phe Glu Thr Gly Ile Lys Val Ile Asp Leu Leu Thr Pro
130 135 140

Tyr Ala Arg Gly Gly Lys Ile Gly Leu Phe Gly Gly Ala Gly Val Gly
145 150 155 160

Lys Thr Val Leu Val Gln Glu Leu Ile His Asn Ile Ala Lys Glu His
165 170 175

Ser Gly Leu Ser Val Phe Ala Gly Val Gly Glu Arg Thr Arg Glu Gly
180 185 190

Asn Asp Leu Tyr Tyr Glu Met Ile Gln Gly Gly Val Ile Asp Lys Thr
195 200 205

Ala Leu Val Phe Gly Gln Met Asn Glu Pro Pro Gly Ala Arg Met Arg
210 215 220

Val Ala Leu Thr Ala Leu Thr Met Ala Glu Tyr Phe Arg Asp His Asp
225 230 235 240

Asn Gln Asp Val Leu Leu Phe Ile Asp Asn Ile Phe Arg Phe Thr Gln
245 250 255

Ala Gly Ser Glu Val Ser Ala Leu Leu Gly Arg Met Pro Ser Ala Val
260 265 270

Gly Tyr Gln Pro Thr Leu Ala Thr Glu Met Gly Gln Leu Gln Glu Arg
275 280 285

Ile Ala Ser Thr Lys Thr Gly Ser Ile Thr Ser Val Gln Ala Ile Tyr
290 295 300

Val Pro Ala Asp Asp Leu Thr Asp Pro Ala Pro Ala Thr Thr Phe Thr
305 310 315 320

His Leu Asp Ala Lys Thr Val Leu Asp Arg Asn Ile Ala Ala Leu Gly
325 330 335

ES 2 388 884 T3

Ile Phe Pro Ala Ile Asn Pro Leu Glu Ser Thr Ser Arg Leu Leu Asp
 340 345 350

Pro Asn Ile Val Gly Ile Asn His Tyr Lys Val Ala Leu Gly Val Gln
 355 360 365

Asn Ile Leu Gln Arg Phe Ala Glu Leu Gln Asp Ile Ile Ala Ile Leu
 370 375 380

Gly Ile Asp Glu Leu Ala Asp Glu Asp Lys Ile Ile Val Glu Arg Ala
 385 390 395 400

Arg Arg Ile Arg Asn Phe Leu Ser Gln Pro Phe Phe Val Ala Glu Lys
 405 410 415

Phe Ser Gly Ile Ala Gly Lys Tyr Val Pro Leu Ser Asp Thr Ile Gln
 420 425 430

Ser Phe Lys Glu Ile Leu Asp Gly Lys His Asp Asp Leu Pro Glu Gln
 435 440 445

Ala Phe Phe Phe Val Gly Thr Ile Gln Glu Ala Val Glu Lys Ala Lys
 450 455 460

Arg Leu Lys Lys Ala Thr Val Glu Glu Lys
 465 470

REIVINDICACIONES

1. Uso del polipéptido con la secuencia de aminoácidos ID SEQ N.º 2 con el fin de detectar, *in vitro*, en muestras biológicas tomadas de un ser humano, la presencia de anticuerpos producidos después de una infección por *Mycoplasma pneumoniae*.
2. Uso con el fin de detectar, *in vitro*, en muestras biológicas tomadas de un ser humano, la presencia de anticuerpos producidos después de una infección por *Mycoplasma pneumoniae*, de un polipéptido que comprende:
- un fragmento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido identificado en la reivindicación 1 y que presenta la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 2, o bien
 - una secuencia de aminoácidos que presenta una similitud de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos del polipéptido identificado en la reivindicación 1 o con un fragmento de la secuencia identificada en a), y que posee la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 2, teniendo en cuenta que:

por «fragmento de la secuencia de aminoácidos» se entiende un polipéptido que comprende por lo menos «n» aminoácidos consecutivos procedentes del polipéptido ID SEQ N.º 2, en el que, en función de las secuencias, n será igual a 7 aminoácidos o más, y

por «que posee la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 2» se entiende una función de antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*.
3. Uso según la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque el polipéptido se prepara cultivando una célula huésped que comprende un vector recombinante que posee, insertado en él, un polinucleótido que codifica para el citado polipéptido y aislando el citado polipéptido del medio de cultivo.
4. Uso según la reivindicación 3, cuando esta es dependiente de la reivindicación 1, caracterizada porque el polinucleótido presenta la secuencia ID SEQ N.º 1.
5. Uso de un polinucleótido con la secuencia ID SEQ N.º 1 con el fin de detectar, *in vitro*, en muestras biológicas tomadas de un ser humano, la presencia de anticuerpos producidos después de una infección por *Mycoplasma pneumoniae*.
6. Uso con el fin de detectar, *in vitro*, en muestras biológicas tomadas de un ser humano, la presencia de anticuerpos producidos después de una infección por *Mycoplasma pneumoniae*, de un polinucleótido que comprende:
- un fragmento de la secuencia del polinucleótido identificado en la reivindicación 5 y que presenta la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 1, o bien
 - una secuencia polinucleotídica que presenta una similitud de al menos el 60 % con la secuencia del polinucleótido identificado en la reivindicación 5 o con un fragmento de la secuencia identificada en a), y que posee la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 1, o bien
 - una secuencia polinucleotídica complementaria a una de las secuencias polinucleotídicas identificadas en la reivindicación 5 o en los puntos a) o b) anteriores, teniendo en cuenta que:

por «fragmento de la secuencia del polinucleótido» se entiende un polinucleótido que comprende por lo menos «n» nucleótidos consecutivos procedentes del polinucleótido ID SEQ N.º 1, en el que, en función de las secuencias, n será igual a 21 nucleótidos o más, y

por «que posee la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 1» se entiende una función de codificación de un polipéptido antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*.
7. Una vacuna para la prevención de infecciones causadas por *Mycoplasma pneumoniae* en seres humanos, que comprende, como principio activo, al menos:
- un polipéptido con la secuencia de aminoácidos ID SEQ N.º 2, o bien
 - un polipéptido cuya secuencia es un fragmento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido identificado en a) y que presenta la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 2, o bien
 - un polipéptido cuya secuencia es una secuencia de aminoácidos que presenta una similitud de al menos el 60 % con la secuencia de aminoácidos del polipéptido identificada en a) o con el fragmento de la secuencia identificada en b), y que posee la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 2, además de un excipiente farmacéuticamente aceptable, teniendo en cuenta que:

por «fragmento de la secuencia de aminoácidos» se entiende un polipéptido que comprende por lo menos «n» aminoácidos consecutivos procedentes del polipéptido ID SEQ N.º 2, en el que, en función de las secuencias, n será igual a 7 aminoácidos o más, y

por «que posee la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 2» se entiende una función de antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*.

5 8. Una vacuna para la prevención de infecciones causadas por *Mycoplasma pneumoniae* en seres humanos, que comprende, como principio activo, al menos:

a) un polinucleótido con la secuencia ID SEQ N.º 1, o bien

b) un polinucleótido cuya secuencia es un fragmento de la secuencia del polinucleótido identificado en a) y que presenta la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 1, o bien

10 c) un polinucleótido cuya secuencia es una secuencia polinucleotídica que presenta una similitud de al menos el 60 % con la secuencia del polinucleótido identificado en a) o con un fragmento de la secuencia identificada en b), y que posee la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 1, o bien

15 d) un polinucleótido cuya secuencia es una secuencia polinucleotídica complementaria a una de las secuencias polinucleotídicas identificadas en a), b) o c), además de un excipiente farmacéuticamente aceptable, teniendo en cuenta que:

por «fragmento de la secuencia del polinucleótido» se entiende un polinucleótido que comprende por lo menos «n» nucleótidos consecutivos procedentes del polinucleótido ID SEQ N.º 1, en el que, en función de las secuencias, n será igual a 21 nucleótidos o más, y

20 por «que posee la misma función que la citada secuencia ID SEQ N.º 1» se entiende una función de codificación de un polipéptido antígeno de *Mycoplasma pneumoniae*.