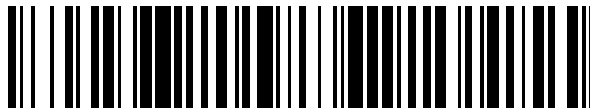


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 418**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/315** (2006.01)

**A61K 39/09** (2006.01)

**A61P 31/04** (2006.01)

**C07K 19/00** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2008 E 08724181 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016 EP 2144924**

54 Título: **Vacuna de proteína de fusión**

30 Prioridad:

**16.04.2007 SE 0700919**  
**29.05.2007 US 940473 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**14.10.2016**

73 Titular/es:

**MINERVAX APS (100.0%)**  
**Ole Maaløes Vej 3**  
**2200 Copenhagen N, DK**

72 Inventor/es:

**LINDAHL, GUNNAR**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 586 418 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

Vacuna de proteína de fusión

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a los campos de la microbiología y la tecnología de vacunas, y se refiere al desarrollo de una vacuna capaz de conferir inmunidad a infecciones por estreptococos del grupo B. Más en particular, la presente invención se refiere a una nueva proteína de fusión que confiere inmunidad a cepas invasivas del estreptococo del grupo B. Se refiere además a una secuencia de nucleótidos aislada que codifica dicha proteína de fusión; un vector; una célula hospedadora; una vacuna; y un procedimiento para prevenir o tratar una infección por estreptococos del grupo B.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El estreptococo del grupo B (*Streptococcus agalactiae*) (EGB) es la principal causa de infecciones bacterianas invasivas, incluida la meningitis, en el periodo neonatal. Sólo en los Estados Unidos, existen en la actualidad unos 5.000 casos al año de enfermedad invasiva causada por esta bacteria. Estas infecciones tienen una mortalidad general de aproximadamente el 10%, y muchos de los lactantes que sobreviven tienen secuelas neurológicas permanentes. A la vista de ello, se ha hecho un gran esfuerzo para encontrar procedimientos de prevención y tratamiento y analizar los mecanismos por los cuales el EGB provoca infecciones.

20 El EGB también puede causar mastitis en las vacas, una enfermedad bovina que es de considerable importancia económica. Por tanto, el desarrollo de una vacuna contra infecciones por EGB tiene interés también en medicina veterinaria.

Aproximadamente el 20% de las mujeres son portadoras vaginales de EGB, y la transmisión vertical desde el aparato genital de la madre es probablemente la fuente más común de infección en enfermedad neonatal causada por esta bacteria. Sin embargo, sólo aproximadamente el 1% de los lactantes que son colonizados por el EGB al nacer se ven aquejados de una infección grave. Por tanto, al desarrollo de la enfermedad neonatal deben contribuir otros factores distintos a la exposición a la bacteria durante el parto.

35 Las cepas estreptocócicas del grupo B se dividen en nueve serotipos (Ia, Ib y II-VIII) basándose en la estructura de la cápsula de polisacáridos (Baker, J Inf Dis 1990. 161: 917). Los cuatro serotipos "clásicos" Ia, Ib, II y III aparecen aproximadamente en las mismas proporciones entre las cepas en la flora normal, pero el tipo III es el serotipo clínicamente más importante, en particular debido a que provoca la mayor parte de los casos de meningitis. Dado que la cápsula es un factor de virulencia conocida, se ha estudiado en detalle considerable, en particular en las cepas de tipo III. Se han hecho esfuerzos para desarrollar una vacuna, en la que la cápsula de polisacáridos de tipo III sería un componente esencial.

40 El documento EP-0.866.133 divulga una vacuna capaz de proteger a un receptor de la infección causada por *Streptococcus* del grupo B. La invención se dirige al uso de una combinación de un polisacárido y un fragmento de la proteína épsilon. Divulga además que los datos epidemiológicos sugieren que la cápsula específica del tipo desempeña un papel importante en la inmunidad a las infecciones por estreptococos del grupo B (véase página 7 línea 2-3). Además, existen diferentes combinaciones entre distintas proteínas y el polisacárido mencionado en la solicitud pero todas las reivindicaciones comprenden un polisacárido que muestra la importancia de ese componente en particular. Sin embargo, el uso de la cápsula de polisacáridos como vacuna puede dar problemas debido a reacciones cruzadas con tejidos humanos (Pritchard y col., Infect Immun 1992. 60: 1598). Por tanto sería muy valioso si se pudiera desarrollar una vacuna basada en proteínas y no en polisacáridos.

50 El documento Gravekamp y col., Infection and Immunity, Dic. 1997, p 5216-5221 divulga la evaluación de la inmunogenia así como la protección del número de repeticiones de la proteína C alfa ( $\alpha$ ) así como la parte del extremo N en solitario. Se encontró que la inmunogenia disminuía con el aumento del número de repeticiones (véase Fig. 2B). Sin embargo, se encontró también en un ensayo de protección que los anticuerpos contra la región de repetición era responsable predominantemente de la protección en comparación con anticuerpos contra la región del extremo N (véase página 5219 columna izquierda, línea 6 desde abajo, y página 5220 columna derecha líneas 26-29).

El documento WO-9.410.317 describe el uso de la proteína alfa, una proteína de superficie de EGB, en el desarrollo

de una vacuna conjugada. Un inconveniente en esta proteína es que normalmente no se expresa mediante cepas de tipo III, que son la causa de muchas infecciones de EGB graves. Por ello, una inmunidad protectora contra estas cepas no será evocada por una vacuna de proteínas alfa.

5 El documento WO-9.421.685 describe el uso de la proteína Rib, una proteína de superficie de EGB, en el desarrollo de una vacuna. Esta proteína provoca inmunidad cuando se administra con alumbre. Sin embargo, la proteína Rib presenta la desventaja de que no evoca una inmunidad protectora contra todas las cepas de EGB.

Larsson y col., VACCINE ELSEVIER LTD, GB LNKD-DOI:10. 1016/s0264-410X(98) 00218-7, vol 17, no 5, 1 feb 10 1999 (1999-0201), páginas 454-458 divulga que el estreptococo del grupo B (EGB) es la causa principal de sepsis y meningitis en los lactantes en sus primeros meses. Muestran que una vacuna de proteínas bivalente, compuesta por proteínas alfa y Rib purificadas mezcladas con hidróxido de aluminio provoca una respuesta de anticuerpos para cada uno de los dos antígenos.

15 En la actualidad, tal como se expone anteriormente, todavía no se dispone de una vacuna adecuada para la prevención de enfermedad por EGB, aunque se ha dedicado un gran esfuerzo a este problema. Claramente, en la actualidad existe una necesidad muy extendida pero no satisfecha de desarrollar procedimientos de prevención y tratamiento de infecciones por EGB. Así, sigue existiendo la necesidad de explorar estrategias de vacunas capaces de conferir inmunidad protectora contra una amplia variedad de cepas de EGB.

20 En consecuencia, un objetivo principal de la presente invención es proporcionar una vacuna capaz de conferir inmunidad protectora contra infecciones por EGB.

Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar una vacuna que confiera inmunidad protectora contra 25 muchas cepas de EGB clínicamente importantes.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una vacuna compuesta por una única proteína de fusión que confiere inmunidad protectora contra infecciones por EGB. La única proteína tiene varias ventajas con respecto a una vacuna compuesta por múltiples proteínas, por ejemplo, el coste de producción y la seguridad.

30 El medio de conseguir los objetivos anteriores, y otros, se hará evidente a partir de la descripción de la invención que se propone a continuación.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

35 Se ha encontrado sorprendentemente que una proteína de fusión que comprende dos regiones no inmunodominantes diferentes, tales como el fragmento en el extremo N de la proteína Rib de EGB fusionada con el fragmento en la región del extremo N de la proteína alfa de EGB, es decir, una fusión entre regiones no inmunodominantes en dos proteínas diferentes expresadas por dos cepas de EGB diferentes, darán origen a una 40 proteína de fusión que da lugar a una protección muy eficiente contra infecciones con las dos diferentes cepas bacterianas, cuando la proteína de fusión se administra a un mamífero en forma de vacuna. Esta protección es conferida por anticuerpos.

En un primer aspecto la invención se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos dos secuencias de 45 aminoácidos, donde las dos secuencias de aminoácidos consisten en una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, fusionada con una segunda secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 4, donde la proteína de fusión es capaz de conferir inmunidad protectora contra el estreptococo del grupo B.

50 Una ventaja importante de la proteína de fusión de la invención es que incluye regiones de las proteínas de superficie relacionadas Rib y alfa, ya se expresen por muchas cepas de estreptococos del grupo B clínicamente importantes, y de forma más importante, se ha demostrado que confieren inmunidad protectora contra estas cepas clínicamente importantes.

55 La proteína de fusión tiene la ventaja de que es inmunógena incluso sin adyuvante, para conferir inmunidad protectora contra cepas de expresión Rib y alfa. Por otra parte, la vacuna de proteína de fusión de la invención puede ser administrada con alumbre, un adyuvante aceptado para su uso en seres humanos. En cambio, según se ha comunicado, la "vacuna universal" descrita recientemente funciona junto con adyuvante de Freund, un

componente muy irritante que no puede usarse en medicina humana (Maione, D. y col., Science 2005. 309:148-150).

Otra ventaja con la presente invención es que una composición de vacuna de acuerdo con la invención puede estar compuesta por una única proteína de fusión y aun así conferir inmunidad protectora contra diferentes infecciones por EGB. Este hecho presenta varias ventajas con respecto a una vacuna compuesta de múltiples proteínas, por ejemplo una única proteína es más sencilla, segura y económica de fabricar que una mezcla que contiene múltiples proteínas.

Más específicamente, la presente invención se refiere a dicha proteína de fusión; una secuencia de nucleótidos aislada; un vector; una célula hospedadora; una vacuna; y un procedimiento para prevenir o tratar una infección por estreptococos del grupo B.

La presente invención se describirá más en detalle, entre otros, con referencia a los dibujos.

15

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra proteínas usadas en los ejemplos. (A) muestra las proteínas Rib y alfa que incluyen sus únicas regiones en el extremo N (regiones N) y sus regiones de repetición largas (regiones R). Se indica el número de restos aa en diferentes regiones y la identidad de los restos. (B) Proteínas recombinantes obtenidas de Rib y alfa. (C) Análisis de proteínas purificadas por SDS-PAGE. (D) Ensayo de inhibición con anticuerpos anti-Rib de ratón. (E) Análisis Dot-blot.

La Figura 2 muestra datos de estudios con inmunización pasiva. (A) Reactividad de antisuero de conejo contra RibN o Rib2R con bacterias de Rib que expresa la cepa BM110 (símbolos abiertos) o su mutante negativo Rib (símbolos cerrados). (B) Vacunación pasiva de ratones con anti-RibN o anti-Rib2R de conejo.

La Figura 3 muestra (A) Análisis de reactividad cruzada entre las regiones en el extremo N de Rib y alfa. (B) Caracterización de anticuerpos de conejo contra RibN-alfaN y Rib2R-alfa2R. (C) Vacunación pasiva de ratones con anticuerpos para las dos proteínas de fusión, seguido por prueba de provocación con Rib que expresa cepa BM110 de tipo III o alfa que expresa la cepa A909 de tipo Ia. (D) Vacunación pasiva con anti-(RibN-alfaN) seguido por prueba de provocación con Rib que expresa cepa de tipo II o alfa que expresa cepa de tipo Ib. (E) Vacunación pasiva con anti-(RibN-alfaN), seguido por prueba de provocación con un mutante BM110 negativo para Rib.

La Figura 4 muestra los resultados de la inmunización activa con la proteína de fusión RibN-alfaN. (A) Inmunogenia de RibN-alfaN cuando se administra con o sin adyuvante. (B) Vacunación activa con RibN-alfaN.

La Figura 5 muestra la comparación de bacterias en cuanto a (A) capacidad de invadir células de la línea de células cervicales humanas ME180. (B) Inhibición de invasión de células epiteliales por anti-(RibN-alfaN).

40

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El término "inmunógeno" significa que tiene la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria. La nueva proteína de fusión de la invención es inmunógena y se caracteriza por su capacidad de provocar una respuesta inmunitaria protectora contra al menos los EGB que contienen la proteína Rib y alfa.

El porcentaje de homología puede determinarse, por ejemplo, por comparación de información de secuencias usando el programa informático GAP, versión 6.0, disponible en el University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). El programa GAP usa el procedimiento de alineación de Needleman y Wunsch (J Mol Biol 1970 48:443), revisado por Smith y Waterman (Adv Appl Math 1981 2:482). De forma sucinta, el programa GAP define la semejanza como el número de símbolos alineados (es decir, nucleótidos o aminoácidos) que son similares, dividido por el número total de símbolos en la más corta de las dos secuencias. Los parámetros por omisión preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación unitaria (que contiene un valor de 1 para identidades y de 0 para no identidades) y la matriz de comparación ponderada de Gribkov y Burgess (Nucl Acids Res 1986 14:6745), tal como se describe en Schwartz y Dayhoff, eds. (Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C. 1979, pp. 353-358); (2) una penalización de 3,0 para cada hueco y una penalización adicional de 0,10 para cada símbolo en cada hueco; y (3) sin penalización para huecos en los extremos.

55

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa cualquier excipiente, adyuvante, soporte o diluyente aceptable usado normalmente en las formulaciones farmacéuticas.

La invención se refiere entre otros a una vacuna que protege frente a infecciones con estreptococos del grupo B (EGB), la causa más importante de infecciones bacterianas potencialmente letales en los recién nacidos. La presente invención se basa en el conocimiento del autor de la invención y en la comprensión de que una proteína de fusión obtenida de las subregiones del extremo N en dos grandes proteínas de superficie de estreptococos del grupo B, las proteínas Rib y alfa, confiere inmunidad protectora.

10 Con el objetivo a largo plazo de desarrollar una vacuna del estreptococo del grupo B (EGB) basada en un único componente, el autor de la invención analizó si una proteína de fusión obtenida de Rib y alfa conferiría inmunidad protectora. El gran tamaño de Rib y alfa, y la inestabilidad genética de las regiones de repetición, implicaba que una proteína de fusión debería obtenerse de subregiones. Sin embargo, la elección de las subregiones no era evidente, dado que existen epítomos protectores en la región de repetición de alfa y Rib. Sorprendentemente, el autor de la  
15 invención ha demostrado que una proteína de fusión obtenida de regiones en el extremo N tenía propiedades superiores a la obtenida de otras regiones de estas proteínas, es decir, las repeticiones, y confirió buena inmunidad protectora.

En la presente memoria descriptiva, salvo que se indique lo contrario, "un" o "una" significa "uno o más".

20 A lo largo de la memoria descriptiva, se incorporan referencias específicamente en la solicitud de patente como referencia.

#### La proteína de fusión

25 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende al menos dos secuencias de aminoácidos, donde las dos secuencias de aminoácidos consisten en una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, fusionada con una segunda secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de  
30 identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 4, donde la proteína de fusión es capaz de conferir inmunidad protectora contra el estreptococo del grupo B.

De acuerdo con una realización, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende un fragmento de región en el extremo N de una proteína Rib de estreptococos del grupo B que se fusiona con un  
35 fragmento de región en el extremo N de una proteína alfa de estreptococos del grupo B, donde dicha proteína de fusión es capaz de conferir inmunidad protectora contra el estreptococo del grupo B.

De acuerdo con otra realización la invención se refiere a una fusión, donde dicha proteína de fusión comprende al menos una primera secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 fusionada con al menos una segunda secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4. Dicha al menos una primera secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2. Dicha al menos una segunda secuencia de aminoácidos comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 4. Se muestra  
45 un ejemplo de una proteína de fusión en la SEQ ID NO: 6, siendo otro ejemplo una proteína de fusión que comprende una mezcla de tres o más secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4.

La proteína Rib del estreptococo del grupo B, también referida en la presente memoria descriptiva como Rib y  
50 proteína Rib, es una proteína de superficie conocida en la técnica, y descrita por ejemplo en el documento WO-9.421.685. La denotación "Rib" se refiere a: resistencia a las proteasas, inmunidad y grupo B. La proteína Rib se aisló por primera vez a partir de una cepa estreptocócica del grupo B de serotipo III como una proteína de 95 kDa diferenciada. La proteína Rib se expresa en casi todas las cepas estreptocócicas del grupo B del serotipo III clínicamente importante, que provoca la mayoría de los casos de meningitis, y por algunas cepas de otros serotipos tales como II. Por otra parte, Rib es expresada por todas las cepas de un clon hipervirulento de tipo III. Se ha ideado un procedimiento para purificar la proteína Rib y se ha demostrado que los anticuerpos para esta proteína protegen  
55 contra la infección letal con cepas que expresan proteína Rib (para más detalles, tales como secuencias de ADN y proteínas, véase el documento WO-9.421.685).

- La proteína alfa de estreptococos del grupo B, también referida en la presente memoria descriptiva como alfa, proteína alfa y antígeno alfa, es una proteína de superficie de estreptococos del grupo B conocida en la técnica. El documento WO-9.410.317 describe una composición conjugada de vacuna que comprende la proteína alfa. La proteína precursora alfa de estreptococos del grupo B natural tal como se describe en el documento WO-9.410.317
- 5 tiene un peso molecular de 108 kDa. La escisión de la posible secuencia de señal de 41 aminoácidos produce una proteína madura de 104 kDa. (Cabe observar, sin embargo, que posteriormente se demostró que la secuencia de señal tiene una longitud de 56 restos de aminoácidos: Stalhammar-Carlemalm y col., J Exp Med 177,1593; 1993). La región del extremo N de 20 kDa del antígeno alfa no muestra homología con las secuencias de proteínas descritas anteriormente y es seguida por una serie de nueve unidades de repetición en tándem formadas por el 74% de la
- 10 proteína madura. Cada unidad de repetición (denotada en la presente memoria descriptiva como "R") es idéntica y consiste en 82 aminoácidos con una masa molecular de aproximadamente 8.500 Dalton, que es codificada por 246 nucleótidos. La región en el extremo C del antígeno alfa contiene un motivo de dominio de anclaje a pared celular presente en una serie de proteínas de superficie grampositivas.
- 15 Cada una de las proteínas Rib y alfa de EGB incluye una única región en el extremo N (N) y una región de repetición larga (R). Las proteínas expresadas por las cepas de EGB BM110 y A909 tienen 12 y 9 repeticiones, respectivamente, tal como se indica en la Figura 1A. Las regiones de anclaje a la pared están situadas en los extremos del extremo C.
- 20 Las repeticiones en tándem en Rib y alfa son idénticas dentro de cada proteína, pero no entre las proteínas, y varían en número entre los aislados. Salvo por esta variación, las secuencias de Rib y alfa son estables entre las cepas. A pesar de la considerable identidad de residuos a.a. (Figura 1A) las dos proteínas muestran poca o ninguna reactividad cruzada antigénica. La proteína R28 es una proteína de superficie de estreptococos del grupo B que confiere inmunidad protectora y promueve la unión a células epiteliales humanas (Stalhammar-Carlemalm y col.
- 25 Molecular Microbiology 1999. 33, 208-219).

La proteína épsilon es una proteína de tipo proteína alfa estreptocócica del grupo B (Creti y col. Clin Microbial. 2004.42:1326-9).

- 30 El término "región en el extremo N" en relación con la presente invención se refiere a una región en el extremo N (N) de una proteína. Los ejemplos de secuencias de aminoácidos de las regiones en el extremo N de Rib y alfa son tal como se indica en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4.

Para los fines de la presente invención el término "proteína de fusión" se refiere a un conjunto de dos o más regiones de proteínas, que comprenden por ejemplo un fragmento de región en el extremo N de una proteína Rib de estreptococos del grupo B y un fragmento de región en el extremo N de una proteína alfa de estreptococos del grupo B. Por ejemplo podría haber una región en el fragmento del extremo N de la proteína Rib y una región en el fragmento del extremo N de la proteína alfa, o 2, 3, 4 ó 5 fragmentos de región en el extremo N de las proteínas Rib y alfa, donde los números de fragmentos de las dos proteínas no son iguales.

40 Los ejemplos de fragmentos de región en el extremo N de una proteína Rib de estreptococos del grupo B y fragmentos de región en el extremo N de una proteína alfa de estreptococos del grupo B, incluyen péptidos que codifican secuencias de aminoácidos naturales de regiones en el extremo N de proteínas alfa y Rib naturales (por ejemplo SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4).

45 Se incluye el posible uso de fragmentos de región en el extremo N de cepas de estreptococos del grupo B diferentes de acuerdo con la presente invención. Esto implicará una ligera variabilidad en la secuencia de los fragmentos de región en el extremo N pero podría no alterar las propiedades biológicas y su capacidad funcional de conferir inmunidad protectora. Por ejemplo, los antígenos alfa y Rib de estreptococos del grupo B aislados de cepas de estreptococos del grupo B diferentes a las divulgadas en la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 pretenden estar comprendidos dentro del alcance de la invención.

50 La combinación de polipéptidos para proporcionar una proteína de fusión puede conseguirse por varios medios, por ejemplo: químicamente por acoplamiento directo o a través de una estructura intermedia; o por fusión biológica molecular, a través de la combinación de moléculas de ácidos nucleicos recombinantes que comprenden fragmentos de ácido nucleico capaces de codificar las dos, de manera que finalmente se produce un único producto de expresión continua.

Para los fines de la presente invención el término "proteína" se refiere a una cadena molecular de aminoácidos. Una

proteína no tiene una longitud específica y puede, si se requiere, ser modificada *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, por glucosilación, amidación, carboxilación o fosforilación. Entre otros, en la definición se incluyen péptidos, oligopéptidos y polipéptidos. La proteína o péptido puede ser de origen natural o sintético. En este contexto una proteína de fusión significa dos o más polipéptidos unidos de forma covalente entre sí ya sea directa o indirectamente por varios medios como los mencionados anteriormente. El término "fusionado" significa la creación de una proteína de fusión tal como se menciona anteriormente.

Las cepas estreptocócicas del grupo B, también referidas en la presente memoria descriptiva como EGB, son bien conocidas y pueden aislarse a partir de la sangre de seres humanos infectados. La EGB es la causa más común de sepsis neonatal en los Estados Unidos y es responsable de aproximadamente 5.000 casos al año.

La denotación "estreptocócico del grupo B" procede del hecho de que los estreptococos se han dividido en grupos inmunológicos basándose en la presencia de antígenos de hidratos de carbono específicos en sus superficies celulares. En la actualidad, se reconocen los grupos A a O (Davis, B.D. y col., En: Microbiology, 3ª edición, página 609, (Harper & Row, 1980).

El término "inmunidad protectora" en relación con la presente invención se refiere a la capacidad de los anticuerpos séricos y/o a la respuesta de linfocitos T citotóxicos inducida durante la inmunización de proteger (parcial o totalmente) contra la enfermedad causada por un agente infeccioso, como un estreptococo del grupo B. Es decir, un vertebrado inmunizado por las vacunas de la invención experimentará un crecimiento limitado y difusión de estreptococos del grupo B. Para determinar si la inmunidad protectora es inducida por una proteína de fusión o vacuna, pueden usarse técnicas bien conocidas por un experto en la materia. Por ejemplo, para determinar si la inmunización con una proteína de fusión o vacuna de la invención induce inmunidad protectora contra infección por el estreptococo del grupo B, puede someterse a animales de ensayo a pruebas de provocación con estreptococo del grupo B y se mide el crecimiento y la difusión del estreptococo del grupo B. Por ejemplo para determinar si se induce inmunidad protectora, pueden usarse procedimientos de acuerdo con los procedimientos descritos en los ejemplos mostrados a continuación.

En una realización de la invención, la proteína de fusión comprende además un fragmento de región en el extremo N de una proteína R28 de estreptococos del grupo B (Genbank número de acceso: AAD39085.1) y/o un fragmento de región en el extremo N de una proteína épsilon de estreptococos del grupo B.

En una realización de la invención, la proteína de fusión de la presente invención comprende secuencias de péptidos de repetición de los fragmentos de región en el extremo N de las proteínas de estreptococo del grupo B (es decir, alfa y Rib).

De acuerdo con una realización de la invención, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene de al menos el 90%, más preferentemente el 95% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 6.

El término "identidad de secuencia" indica una medida cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de aminoácidos de igual longitud o entre dos secuencias de nucleótidos de igual longitud. Si las dos secuencias comparadas no tienen igual longitud, deben alinearse lo mejor posible. La identidad de secuencia puede calcularse, por ejemplo, mediante el programa BLAST por ejemplo el programa BLASTP o el programa BLASTN (Pearson W. R y D. J. Lipman (1988) PNAS USA 85:2444-2448) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)).

De acuerdo con una realización adicional de la invención, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 6.

#### 50 Sistemas de ADN y expresión aislados

En un segundo aspecto de acuerdo con la presente invención, se proporciona una molécula de secuencia de nucleótidos/ADN aislada que comprende una secuencia de nucleótidos/secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión de acuerdo con la invención. Un ejemplo es una secuencia de nucleótidos que comprende al menos una primera secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o fragmentos de la misma fusionados con al menos una segunda secuencia de nucleótidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 3 o fragmentos de la misma.

Además, se proporciona un sistema de expresión recombinante que incluye vectores y células hospedadoras.

Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones de hospedador/vector de expresión para expresar las secuencias de nucleótidos de la presente invención. Los vectores de expresión útiles para hospedadores eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus, virus adenoasociados, citomegalovirus y retrovirus. Los vectores de expresión útiles para hospedadores bacterianos incluyen plásmidos bacterianos, tales como los de *E. coli*, lo que incluye vectores pBluescript, pGEX2T, pUC, col E1, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos de una amplia variedad de hospedadores, tales como RP4, fagos de ADN, por ejemplo, los numerosos derivados de fagos lambda, por ejemplo, lambda GT10 y lambda GT11, NM989, y otros fagos de ADN, tales como M13 y fagos de ADN monocatenario filamentosos. Los vectores de expresión útiles para células de levaduras incluyen el plásmido y 2.mu. y derivados del mismo. Los vectores útiles para células de insectos incluyen pVL 941.

Además, en estos vectores puede usarse cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión para expresar las secuencias de nucleótidos/secuencias de ADN de la presente invención. Las secuencias de control de expresión útiles incluyen las secuencias de control de expresión asociadas con genes estructurales de los vectores de expresión precedentes. Los ejemplos de secuencias de control de expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos de SV40 o adenovirus, el sistema lac, el sistema trp, el sistema TAC o TRC, los promotores T3 y T7, las regiones de fagos lambda de operadores y promotores mayores, las regiones de control de la proteína de recubrimiento fd, el promotor para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los promotores de fosfatasa ácida, por ejemplo, Pho5, los promotores del sistema de acoplamiento alfa de levaduras y otras secuencias de promotores constitutivas e inducibles de las que se conoce que controlan la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus, y diversas combinaciones de los mismos.

Las células hospedadoras transformadas con los vectores anteriores forman un aspecto adicional de la presente invención. Una amplia variedad de células hospedadoras unicelulares son útiles porque expresan las secuencias de nucleótidos/secuencias de ADN de la presente invención. Estos hospedadores pueden incluir hospedadores eucariotas y procariotas bien conocidos, tales como las cepas gramnegativas y grampositivas, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Aspergillus*, *Shigella*, *Salmonella*, *Listeria*, hongos, levaduras, células de insectos tales como *Spodoptera frugiperda* (SF9), células animales tales como CHO y células de ratón, células de mono verde africano tales como COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40 y BMT 10, células humanas, y células vegetales en cultivo tisular. Los organismos hospedadores preferidos incluyen bacterias tales como *E. coli* y *B. subtilis*, y células de mamíferos en cultivo tisular.

Naturalmente, debe entenderse que no todos los vectores y secuencias de control de expresión actuarán con la misma efectividad para expresar las secuencias de nucleótidos/secuencias de ADN de la presente invención. Tampoco todos los hospedadores actuarán con igual efectividad en el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la materia puede realizar una selección entre estos vectores, secuencias de control de expresión y hospedadores sin una experimentación indebida y sin alejarse del alcance de la presente invención. Por ejemplo, en la selección de un vector, el hospedador debe considerarse ya que el vector debe replicarlo. El número de copias del vector, la capacidad de controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tales como marcadores antibióticos, también deben tenerse en cuenta. En la selección de una secuencia de control de expresión, deben considerarse también diversos factores. Entre ellos se incluyen, por ejemplo, la fuerza relativa de la secuencia, su capacidad de control y su compatibilidad con las secuencias de nucleótidos/secuencias de ADN de la presente invención, en particular en lo que respecta a las estructuras secundarias potenciales. Los hospedadores unicelulares deben seleccionarse en consideración de su compatibilidad con el vector escogido, la toxicidad del producto codificado por las secuencias de nucleótidos/secuencias de ADN de la presente invención, sus características de secreción, su capacidad de plegamiento correcto de la proteína, sus requisitos de fermentación o cultivo y la facilidad de purificación de los productos codificados por las secuencias de nucleótidos/secuencias de ADN de la presente invención. Dentro de estos parámetros, un experto en la materia puede seleccionar varias combinaciones de vectores/secuencias de control de expresión/hospedadores que expresarán las secuencias de nucleótidos/secuencias de ADN de la presente invención en cultivo o en cultivo animal a gran escala.

Los polipéptidos codificados por las secuencias de nucleótidos/secuencias de ADN de la presente invención pueden aislarse a partir del cultivo microbiano o el cultivo celular y purificarse usando cualquiera de una diversidad de procedimientos convencionales que incluyen: cromatografía líquida por ejemplo normal o de fase inversa, usando HPLC, FPLC y similares; cromatografía de afinidad (por ejemplo con ligandos inorgánicos o anticuerpos monoclonales); cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de exclusión de tamaños; cromatografía de quelatos metálicos inmovilizados; electroforesis en gel; y similares. Un experto en la materia puede seleccionar las técnicas más apropiadas de aislamiento y purificación sin alejarse del alcance de la presente invención.



Además, los polipéptidos de la presente invención pueden generarse mediante cualquiera de las diversas técnicas químicas. Por ejemplo, pueden prepararse usando la técnica de síntesis de fase sólida descrita originalmente por R. B. Merrifield (J Am Chem Soc 1963 83:2149-54), o pueden prepararse por síntesis en solución. Puede encontrarse un resumen de las técnicas de síntesis de péptidos en E. Gross & H. J. Meinhofer, 4 The Peptides: Analysis Synthesis, Biology; Modern Techniques of Peptide and Amino acid Analysis, John Wiley & Sons, (1981); y M. Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag (1984).

Las composiciones y procedimientos preferidos de la presente invención comprenden polipéptidos que tienen una inmunogenia mejorada. Dichos polipéptidos pueden obtenerse cuando se modifican las formas naturales de los polipéptidos o fragmentos de los mismos o se someten a tratamientos para mejorar su carácter inmunógeno en el receptor pretendido. Se dispone de numerosas técnicas que son bien conocidas por los expertos en la materia que puede usarse, sin experimentación innecesaria, para incrementar sustancialmente la inmunogenia de los polipéptidos divulgados en la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, los polipéptidos pueden modificarse mediante acoplamiento a grupos dinitrofenol o ácido arsanílico, o por desnaturalización con calor y/o SDS. En particular si los polipéptidos son polipéptidos pequeños sintetizados químicamente, puede ser conveniente acoplarlos a un soporte inmunógeno. El acoplamiento, naturalmente, no debe interferir con la capacidad del polipéptido o del soporte para funcionar apropiadamente. Para una revisión de algunas consideraciones generales en las estrategias de acoplamiento, véase Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ed. E. Harlow y D. Lane (1988). Los soportes inmunógenos útiles son bien conocidos en la técnica. Algunos ejemplos de dichos soportes son hemocianina de lapa californiana (KLH); albúminas tales como albúmina de suero bovino (BSA) y ovoalbúmina, PPD (derivado proteico purificado de tuberculina); eritrocitos; toxoide tetánico; toxoide del cólera; perlas de agarosa; carbón activado; o bentonita.

La expresión puede realizarse también en los denominados sistemas de expresión de células libres. Dichos sistemas comprenden todos los factores esenciales para la expresión a partir de un ácido nucleico recombinante apropiado, ligado operativamente a un promotor que actuará en ese sistema en particular.

Las secuencias de nucleótidos/secuencias de ADN de las regiones en el extremo N de Rib y alfa son tal como se indica en las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3, y las secuencias de nucleótidos/secuencia de ADN de la proteína de fusión usadas en los ejemplos mostrados a continuación son tal como se muestra en la SEQ ID NO: 5.

En una realización la invención se refiere a un procedimiento de producción de dicha proteína de fusión que comprende las etapas de proporcionar una célula hospedadora tal como se divulga anteriormente que comprende una secuencia de nucleótidos tal como se describe anteriormente, multiplicar dicha célula hospedadora en un medio hospedador adecuado bien conocido para un experto en la materia, purificar dicha proteína de fusión usando una o más de las técnicas mencionadas anteriores y obtener dicha proteína de fusión, que puede usarse adicionalmente para la preparación de una vacuna tal como se describe más adelante.

#### 40 Composiciones de vacunas

En un tercer aspecto de acuerdo con la presente invención, se proporciona una vacuna que comprende la proteína de fusión de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición de vacuna de la presente invención puede, además de la proteína de fusión, comprender otros ingredientes farmacéuticamente aceptables tales como sales, tampones, componentes inmunoactivos, adyuvantes, agentes de humidificación, agentes emulsionantes y de suspensión o agentes edulcorantes, saborizantes, aromatizantes u otras sustancias que son convenientes para mejorar la eficacia de la composición. Una composición se dice "farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un receptor individual.

También puede prepararse una vacuna multivalente combinando la proteína de fusión con otros componentes, lo que incluye pero no se limita a toxoide de la difteria o toxoide tetánico, o polisacáridos, usando técnicas conocidas en la técnica.

Otros ejemplos de las proteínas preferidas de una vacuna multivalente de la presente invención incluyen proteínas de superficie adicionales del estreptococo del grupo B, o sus equivalentes, tales como la proteína R28 y la proteína épsilon.

En una realización, la composición de vacuna de la presente invención comprende un fragmento de una proteína R28 del estreptococo del grupo B y/o un fragmento de una proteína épsilon del estreptococo del grupo B.

Los procedimientos para la preparación y formulación de composiciones de vacunas son bien conocidos por los expertos en la materia. La elección de ingredientes variará por ejemplo dependiendo de la vía de administración de la composición. Por ejemplo las composiciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones y emulsiones. Los Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Pueden usarse soportes o apósitos oclusivos para aumentar la permeabilidad de la piel y potenciar la absorción de antígenos. Las formas de dosificación líquida para administración oral pueden comprender generalmente una solución de liposomas que contiene la forma de dosificación líquida. Las formas adecuadas para suspensión de liposomas incluyen emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como agua purificada.

La composición de vacuna de la presente invención puede comprender un componente inmunoactivo adicional. The componente inmunoactivo adicional puede ser un antígeno, una sustancia de refuerzo inmunitario y/o una vacuna; cualquiera de los cuales puede comprender un adyuvante.

Los adyuvantes son sustancias que pueden usarse para aumentar específicamente una respuesta inmunitaria específica. Normalmente, el adyuvante y la composición se mezclan antes de la presentación ante el sistema inmunitario, o se presentan por separado, pero en el mismo punto del animal o el ser humano sujeto a inmunización. Los adyuvantes pueden dividirse en términos generales en varios grupos basándose en su composición. Estos grupos incluyen adyuvantes oleosos (por ejemplo, de Freund completo e incompleto), sales minerales como,  $AlK(SO_4)_2$ ,  $AlNa(SO_4)_2$ ,  $AlNH_4(SO_4)$ , sílice, caolín y carbono), polinucleótidos (por ejemplo, ácidos poli IC y poli AU), y algunas sustancias naturales (por ejemplo, cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, así como sustancias presentes en *Corynebacterium parvum* o *Bordetella pertussis*, y miembros del género *Brucella*. Entre las sustancias especialmente útiles como adyuvantes están las saponinas tales como, por ejemplo, Quil A. Se proporcionan ejemplos de materiales adecuados para su uso en composiciones de vacunas en Remington's Pharmaceutical Sciences (Osol, A, Ed, Mack Publishing Co, Easton, PA, pp. 1324-1341 (1980).

En una realización adicional, la proteína de fusión de la invención puede usarse como soporte para un polisacárido en una vacuna conjugada. En esta realización la vacuna comprende una proteína, es decir la proteína de fusión, conjugada con un polisacárido (tal como un polisacárido capsular).

El uso de un polipéptido, proteína o proteína de fusión como soporte para un polisacárido en una vacuna conjugada es bien conocido en la técnica, véanse por ejemplo los documentos US-6.855.321, WO-9.410.317 y US-4.496.538).

Por polisacárido se indica cualquier polímero lineal o ramificado que consiste en restos de monosacáridos, unidos normalmente por enlaces glucosídicos, e incluye así los oligosacáridos. Preferentemente, el polisacárido contendrá entre 2 y 50 unidades de monosacáridos, más preferentemente entre 6 y 30 unidades de monosacáridos.

El componente de polisacáridos puede basarse en u obtenerse de componentes de polisacáridos de la cápsula de polisacáridos de muchos patógenos bacterianos grampositivos y gramnegativos tales como *H. influenzae*, *N. meningitidis* y *S. pneumoniae*. Otras bacterias a partir de las que pueden conjugarse componentes de polisacáridos en las proteínas de soporte de la presente invención incluyen *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Shigella dysenteriae*. Los componentes de polisacáridos adecuados para su uso de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen el oligosacárido Hib, lipopolisacáridos de *Pseudomonas aeruginosa* (Seid y Sadoff, 1981), lipopolisacáridos de *Salmonella* (Konadu y col., 1996) y el polisacárido O-específico de *Shigella dysenteriae* (Chu y col., 1991). Otros componentes de polisacáridos adecuados para su uso de acuerdo con la presente invención serán bien conocidos para los expertos en la materia.

Los fragmentos de polisacáridos capsulares bacterianos pueden producirse mediante cualquier procedimiento adecuado, tal como hidrólisis ácida o irradiación ultrasónica (Szn y col., 1986). Otros procedimientos de preparación de los componentes de polisacáridos serán bien conocidos para los expertos en la materia.

En una realización de la presente invención, el polisacárido es un polisacárido capsular derivado de un estreptococo del grupo B, o sus equivalentes.

El componente de polisacáridos de la vacuna conjugada debe acoplarse preferentemente con la proteína de soporte mediante una unión covalente. Un procedimiento de acoplamiento de polisacáridos y proteínas especialmente preferido consiste en aminación reductora. Otros procedimientos incluyen: activación del polisacárido con bromuro

de cianógeno seguido por reacción con dihidracida de ácido adípico (separador) y por conjugación con grupos carbóxido de proteína de soporte usando carbodiimidias solubles (Shneerson y col., 1986); funcionalización de la proteína de soporte con dihidracida de ácido adípico seguido por acoplamiento con polisacáridos activados con bromuro de cianógeno (Dick y col., 1989); modificación química de la proteína de soporte y el polisacárido seguido por su acoplamiento (Marburg y col., 1986; Marburg y col., 1987 y 1989).

La molécula de polisacárido puede acoplarse con la proteína de soporte mediante una molécula de separador, tal como ácido adípico. Esta molécula de separador puede usarse para facilitar el acoplamiento de la proteína al polisacárido. Después de haber realizado la reacción de acoplamiento, el conjugado puede purificarse por diafiltración u otros procedimientos conocidos para eliminar la proteína o los componentes de polisacáridos que no han reaccionado.

Si el polisacárido procede de un patógeno bacteriano diferente de EGB, el conjugado puede conferir inmunidad contra dos o más patógenos, por ejemplo múltiples tipos de bacteria. Esta es una aplicación potencialmente importante de la proteína de fusión. Para la preparación de una vacuna conjugada, sería una ventaja considerable que la parte de proteína estuviera compuesta por una única proteína de fusión.

Para un experto en la materia es evidente que la composición de vacuna de la presente invención puede comprender otras sustancias o compuestos no mencionados anteriormente, tales como otros diluyentes, agentes emulsionantes o de estabilización, u otras proteínas o polisacáridos. Dichas sustancias o compuestos deben conferir las propiedades deseadas a la composición.

#### Procedimientos para prevenir y tratar infecciones por estreptococos del grupo B

En aspectos adicionales de acuerdo con la presente invención, se proporcionan procedimientos para prevenir o tratar una infección causada por un estreptococo del grupo B. Estos procedimientos comprenden la administración a un individuo de una cantidad farmacéuticamente eficaz de la vacuna de la invención. De acuerdo con la presente invención, se proporciona también el uso de la composición inmunógena de la invención para la fabricación de una vacuna para prevenir o tratar una infección causada por un estreptococo del grupo B.

La inmunoprofilaxis materna con una vacuna, para proteger frente a infección por estreptococo del grupo B a la madre y al lactante, se ha propuesto como una posible vía.

Los términos "prevención o tratamiento" en sus diversas formas gramaticales en relación con la presente invención se refieren a prevención, cura, reversión, atenuación, alivio, mejoría, inhibición, minimización, supresión o interrupción de (1) los efectos perjudiciales de un trastorno asociados con una infección por estreptococo del grupo B, (2) progresión del trastorno, o (3) agente causante del trastorno (estreptococo del grupo B). Además, se contempla que los términos "prevención o tratamiento" incluyen la creación de inmunidad total o parcial del individuo a la infección por estreptococo del grupo B.

De acuerdo con una realización, el procedimiento de prevención o tratamiento comprende la administración a una mujer una cantidad efectiva de la vacuna de la invención capaz de conferir inmunidad a la infección por estreptococo del grupo B para los descendientes no nacidos de dicha mujer. De acuerdo con esta realización, la vacuna se administra a una mujer no gestante o a una mujer gestante, en condiciones de tiempo y cantidad suficientes para originar la producción de anticuerpos que sirven para proteger a la mujer y a un feto o un neonato (por transferencia pasiva de anticuerpos a través de la placenta).

En una realización adicional, el procedimiento para prevenir o tratar una infección causada por un estreptococo del grupo B comprende la administración a un individuo de una cantidad efectiva de un antisuero provocada por la exposición de un segundo individuo a una vacuna de la invención. De acuerdo con esta realización, la resistencia al estreptococo del grupo B se confiere al individuo por inmunización pasiva, es decir, la vacuna se proporciona a un voluntario como hospedador (es decir, un ser humano o un mamífero), y el antisuero obtenido se recupera y se proporciona directamente a un receptor en el que se sospecha la existencia de una infección causada por un estreptococo del grupo B. Se contempla que dicho antisuero podría administrarse a una mujer gestante (en o antes del parto), en condiciones de tiempo y cantidad suficientes de manera que el antisuero serviría para proteger al feto o al neonato (por incorporación pasiva de los anticuerpos a través de la placenta).

La vacuna o antisuero de la presente invención puede proporcionarse, así, antes del inicio de infección (para prevenir o atenuar una infección anticipada) o después del inicio de una infección real.

La composición de vacuna o el antisuero de acuerdo con la invención puede administrarse a seres humanos o animales, incluidos mamíferos o aves, tales como roedores (ratón, rata, cobaya o conejo); aves (pavo, gallina o pollo); otros animales de granja (vaca, caballo, cerdo o lechón); animales domésticos (perro, gato y otros animales domésticos); y seres humanos. Aunque muchos animales pueden tratarse con la preparación de la invención, un sujeto preferido para el tratamiento es un ser humano o un animal o ganado de valor comercial.

La composición de vacuna o el antisuero de acuerdo con la invención puede administrarse a un individuo de acuerdo con procedimientos conocida en la técnica. Dichos procedimientos comprenden la aplicación por ejemplo parenteral, tal como a través de todas las vías de inyección en o a través de la piel: por ejemplo intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, mucosa, submucosa o subcutánea. También pueden aplicarse por aplicación tópica como gotas, nebulizador, gel o pomada en el epitelio mucoso del ojo, la nariz, la boca, el ano o la vagina, o en la epidermis de la piel externa en cualquier parte del cuerpo. Otras vías posibles de aplicación son mediante nebulización, aerosol o aplicación de polvos a través de la inhalación por las vías respiratorias. En este último caso el tamaño de partículas que se usa determinará la profundidad en la que penetrarán las partículas en las vías respiratorias. Alternativamente, la aplicación puede realizarse a través de la vía alimentaria, mediante combinación con el alimento, la comida o el agua potable, por ejemplo, en forma de polvo, un líquido o un comprimido, o por administración directamente en la boca como un líquido, un gel, un comprimido o una cápsula, o en el ano en forma de supositorio. La vacuna puede administrarse también en forma de una vacuna de ADN.

Existen muchas técnicas diferentes para definir los tiempos de las inmunizaciones. Es posible usar las composiciones de la invención más de una vez para aumentar los niveles y las diversidades de expresión del repertorio de inmunoglobulinas expresado por el animal inmunizado. Normalmente, si se administran múltiples inmunizaciones, se harán con una separación de dos meses.

El término "cantidad efectiva" en relación con la presente invención se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una dolencia y un régimen de determinados. Se trata de una cantidad predeterminada de material activo calculado para producir un efecto terapéutico deseado en asociación con los aditivos y diluyentes requeridos; es decir, un soporte, o vehículo de administración. Además, significa una cantidad suficiente para reducir y con la máxima preferencia prevenir un déficit clínicamente significativo en la actividad y respuesta del hospedador. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para provocar una mejora en una dolencia clínicamente significativa en un hospedador. Tal como observan los expertos en la materia, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Las cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con los diluyentes requeridos; es decir, el soporte, o aditivo. Además, la dosificación que se administrará variará dependiendo del principio o principios activos que se usarán, la edad, el peso, etc., del individuo sujeto a tratamiento.

Generalmente, la dosificación consistirá en una inyección inicial, muy probablemente con adyuvante, de aproximadamente 0,01 a 10 mg, y preferentemente de 0,1 a 1,0 mg, de antígeno de proteína de fusión por individuo, seguido muy probablemente por una o tal vez más inyecciones de refuerzo. Preferentemente, las inyecciones de refuerzo se administrarán aproximadamente de 1 a 6 meses después de la inyección inicial.

## EJEMPLOS

Para comprender mejor la presente invención, se exponen los siguientes ejemplos. Debe entenderse, sin embargo, que los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención y la invención no pretende limitarse a las condiciones y detalles específicos descritos en estos ejemplos.

En los ejemplos mostrados a continuación, se usaron las siguientes cepas de estreptococos del grupo B (EGB): A909 (tipo Ia) SB35sed1 (tipo Ib); 1954/92 (tipo II); y BM110 (tipo III) (Larsson y col. Infect. Immun. 1996. 64:3518-3523; Stalhammar-Carlemalm y col. J. Exp.Med. 1993. 177:1593-1603). La cepa BM110 es un miembro del hipervirulento clon ST-17. Todas las cepas de EGB se cultivaron en caldo de Todd-Hewitt a 37°C sin agitación.

Todas las cepas a las que se hace referencia en la presente memoria descriptiva pueden obtenerse de los autores de la invención en la Universidad de Lund y el Hospital Universitario de Lund (Doctor Gunnar Lindahl, Departamento de Microbiología Médica, Solvegatan 23, SE-22362 Lund, Suecia).

### **Ejemplo 1: Construcción de los mutantes bacterianos negativos para Rib y alfa**

Se obtuvo un mutante negativo de Rib BM110. Se subclonó un fragmento de ~ 7 kb, que alojaba el gen rib y secuencias flanqueantes, en pJRS233 (Perez-Casal y col., Mol. Microbiol. 1993. 8:809-819). Se suprimió el gen rib por PCR inversa y se sustituyó por una casete de resistencia a la kanamicina. Después de transformación en BM110, se aisló un mutante negativo de Rib por recombinación homóloga (Perez-Casal, J. y col., 1993). El gen rib completo está ausente de este mutante, a diferencia de lo descrito anteriormente (Waldemarsson y col. J. Bacteriol. 2006. 188:378-388). La estructura del mutante se confirmó por PCR. El mutante carecía de reactividad frente al suero anti-Rib pero no se vio afectado en la expresión de la cápsula. Se construyó un mutante negativo alfa A909 por técnicas similares. Este mutante carecía de reactividad con suero anti-alfa pero no se vio afectado en la expresión de la proteína beta o cápsula.

### **Ejemplo 2: Construcción de proteínas de fusión y otros derivados de Rib y alfa**

En los ejemplos descritos en la presente memoria descriptiva, se emplearon las proteínas intactas y una serie de proteínas recombinantes (véase Figura 1B). Se clonaron fragmentos del gen rib (SEQ ID NO: 1) en BM110 y el gen bca, que codifica la proteína alfa (SEQ ID NO: 3) en A909 en pGEX-6P-2 (Amersham) y se usó para la preparación de fusiones GST. Después de la retirada de la fracción GST, los derivados purificados tenían la secuencia en el extremo N GPLGS. RibN y Rib2R corresponden a los restos aa 1-174 y 175-332, respectivamente, de Rib, y alfaN corresponde a los restos 1-170 de alfa (numeración de Wästfelt y col. J. Biol. Chem. 1996. 271:18892-18897). RibN-alfaN contiene aa 1-174 de Rib y aa 1-170 de alfa, mientras que Rib2R-alfa2R 12 contiene aa 175-332 de Rib y aa 171-334 de alfa. Debido a los procedimientos usados, cada proteína de fusión incluía la secuencia EF entre las dos regiones. Rib y alfa se purificaron a partir de BM110 y A909, respectivamente.

### **Ejemplo 3: Análisis de proteínas purificadas**

La Figura 1C muestra el análisis de proteínas purificadas por SDS-PAGE. La figura se combina a partir de dos geles. Los números de la izquierda indican la masa molecular en kDa. Dado que Rib y alfa migran de forma aberrante en geles, los tamaños aparentes de las proteínas no se corresponden exactamente con los deducidos de las secuencias a.a.

### **Ejemplo 4: Prueba de inmunodominancia de las regiones de repetición de Rib y alfa**

Se obtuvo antisuero de conejo por inmunización s.c. con ~ 35 µg de proteína en CFA, seguido por dos refuerzos con ~ 18 µg de proteína en IFA. Se inmunizó a ratones s.c. con 25 µg de proteína con o sin adyuvante, tal como se indica, se les administró un refuerzo después de 4 semanas con 12 µg de proteína, y se sangraron dos semanas más tarde. Para los ratones CFA, el refuerzo se administró con IFA.

Se realizaron pruebas de unión a anticuerpos e inhibición (Figura 1D) esencialmente tal como se ha descrito (Stalhammar-Carlemalm y col., J. Exp. Med. 1993. 177:1593-1603; Wästfelt y col. J. Biol. Chem. 1996. 271:18892-18897) para analizar si los anticuerpos anti-Rib de ratón, activados con alumbre como adyuvante, se dirigían contra la región en el extremo N y/o la región de repetición. Los anticuerpos, activados con alumbre como adyuvante, se usaron para detectar Rib puro inmovilizado en pocillos de microvaloración y la unión se inhibió por adición de la proteína pura indicada (2 µg). Se detectaron anticuerpos de conejo ligados con proteína G radiomarcada, y se detectaron anticuerpos de ratón ligados por incubación con Ig de conejo antirratón seguido por proteína G radiomarcada. La unión se calculó en % de proteína G ligada con antisuero de la menor dilución. Se optimizó la sensibilidad de las pruebas de inhibición (Figura 1D) usando una solución de recubrimiento a 0,05 µg/ml y suero de ratón diluido 1.000 veces. Todas las pruebas se realizaron al menos tres veces, y se indican las DT. Para análisis dot blot, se incubaron membranas con el suero de ratón indicado y se detectaron los anticuerpos ligados por incubación con Ig antisuero de conejo, seguido por proteína G radiomarcada y autorradiografía.

La unión a Rib se inhibió completamente con Rib, tal como se esperaba, y se observó también inhibición casi completa con Rib2R, mientras que RibN tenía un efecto muy pequeño. Así, casi todos los anticuerpos se dirigieron contra las repeticiones. La inhibición por Rib2R no era inespecífica ya que no inhibió la unión de anticuerpos a un antígeno EGB no relacionado (datos no mostrados).

En el sistema alfa, un análisis Dot-blot mostró que anti-alfa reaccionaba con alfa intacto pero no con alfaN (Figura 1E, izquierda). La ausencia de reactividad de alfaN no era una propiedad inherente de esa construcción, dado que anti-alfaN reaccionaba con alfa y con alfaN (Figura 1E, derecha).

El motivo de la inmunodominancia de las regiones de repetición en Rib y alfa no se conoce. Pueden contribuir las interacciones multivalentes entre las repeticiones y los receptores Ig en linfocitos B, pero Rib y alfa no son antígenos independientes de los linfocitos T, dado que provocan respuestas IgG. Cabe observar que la escasa respuesta inmunitaria a las regiones de extremo NH<sub>2</sub> no se debía a enmascaramiento, dado que estas regiones están disponibles para los anticuerpos (véase más adelante).

#### **Ejemplo 5: Vacunación pasiva**

10 Dado que los anticuerpos a Rib y alfa se dirigen casi exclusivamente contra las repeticiones y son protectores, parecería que una vacuna de proteína de fusión debería obtenerse de las repeticiones. Sin embargo, los datos disponibles no excluían que las regiones aisladas en el extremo N podrían ser más protectores que las repeticiones y serían adecuados para la construcción de una proteína de fusión. Para analizar esta hipótesis usamos el sistema Rib para comparar directamente la capacidad protectora de los anticuerpos dirigidos contra la región en el extremo N  
15 o las repeticiones. El análisis empleó anticuerpos de conejo provocados por RibN o Rib2R y un modelo de ratón de vacunación pasiva.

Las vacunaciones pasivas se realizaron tal como se describe (Stålhammar-Carlemalm y col., J. Exp. Med. 1993. 177:1593-1603), usando ratones C3H/HeN, antisero de conejo y una dosis DL<sub>90</sub> de bacterias en fase logarítmica (10<sup>5</sup>-10<sup>9</sup> UFC, dependiendo de la cepa usada). Se registró la supervivencia durante un periodo de 96 h. Para  
20 vacunaciones activas, se inmunizó a ratones s.c. con 10 µg de proteína, se mezcló con alumbre. Se suministraron 5 µg de refuerzo después de 4 semanas, con alumbre. Los ratones de control recibieron PBS y alumbre. Dos semanas después del refuerzo se realizó en los ratones una prueba de provocación con una dosis DL<sub>90</sub> de bacterias y se registró la supervivencia. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité de revisión local en estudios con  
25 animales.

Los anticuerpos reaccionaron con bacterias que expresan Rib, pero no con un mutante negativo de Rib, lo que muestra que reconocieron epítomos en la forma nativa de Rib (Figura 2A). Dado que anti-RibN tenía una valoración ~ 7 veces mayor que anti-Rib2R se diluyó en consecuencia, para permitir comparaciones directas en el modelo de  
30 ratón. En este modelo, cada antisuero protegió frente a infección letal (Figura 2B), y la anti-RibN diluida protegió al menos tanto como la anti-Rib2R no diluida. Los valores p se refieren a comparaciones con el control previo a inmunización a 96 h. Los resultados en el sistema Rib sugirieron que una proteína de fusión obtenida de las regiones en el extremo N de Rib y alfa debería compararse con la obtenida de las repeticiones. Sin embargo, no era evidente que una proteína de fusión obtenida de las regiones en el extremo N fuera necesaria, dado que estas regiones  
35 mostraban el 61% de identidad de restos (Figura 1A), lo que sugería que podrían experimentar reactividad cruzada. La reactividad cruzada podría haber pasado desapercibida en estudios previos, que emplearon anticuerpos contra las proteínas intactas, es decir, anticuerpos dirigidos principalmente contra las repeticiones.

Esta hipótesis se analizó con anti-RibN y anti-alfaN (Figura 3A). Cada antisuero reaccionó con la bacteria completa de la cepa que expresa Rib BM110 (izquierda, símbolos abiertos) pero no con un mutante negativo de Rib (izquierda, símbolos cerrados). Análogamente, cada antisuero reaccionó con bacterias de la cepa que expresa alfa A909 (derecha, símbolos abiertos) pero no con el mutante alfa-negativo (derecha, símbolos cerrados). Se obtuvieron  
40 datos similares con dos sueros de conejo de cada tipo. Esto indica que las regiones en el extremo N carecen de reactividad cruzada. Por tanto, la proteína de fusión RibN-alfaN se construyó y se comparó con una proteína de fusión de tamaño similar obtenida de las repeticiones, Rib2R-alfa2R. En el conejo, la proteína de fusión RibN-alfaN provocó mejores respuestas de anticuerpos que la Rib2R-alfa2R, valorado por reactividad con bacterias que expresan Rib o alfa (Figura 3B). Para comparaciones en el modelo de ratón de protección pasiva, anti-(RibN-alfaN) se diluyó por tanto con la misma valoración que anti-(Rib2R-alfa2R). Cada antisuero protegió frente a la cepa de tipo III que expresa Rib y una cepa de tipo Ia que expresa alfa (Figura 3C). Así, cada una de las dos proteínas de fusión  
45 provocó anticuerpos reactivos dirigidos contra Rib y alfa.  
50

#### **Ejemplo 6: Vacunación pasiva para múltiples serotipos de EGB**

El modelo de vacunación pasiva se usó para analizar si la protección proporcionada por anti-(RibN-alfaN) es independiente del serotipo capsular. Se observó buena protección en experimentos con una cepa de tipo II que expresa Rib y una cepa de tipo Ib que expresa alfa (Fig. 3D). Así, anti-(RibN-alfaN) protegía contra las cepas que expresan Rib y alfa de los cuatro serotipos clásicos, Ia, Ib, II y III. Esta protección era inespecífica, dado que anti-(RibN-alfaN) no protegía contra un mutante negativo de Rib (Figura 3E). Debe observarse que para este análisis podría usarse el mutante negativo Rib, dado que no reducía la virulencia en el modelo de ratón. Los anticuerpos

para RibN-alfaN también reconocieron cepas que expresan dos proteínas relacionadas con Rib y alfa, las proteínas R28 y épsilon, que son expresadas por muchas cepas de serotipos V y la, respectivamente (Lindahl y col. Clin. Microbiol. Rev 2005. 18:102-127; Brimil y col. Int J Med. Microbiol. 2006. 296:39-44). Sin embargo, la protección contra cepas que expresan R28 o épsilon puede requerir la construcción de una proteína de fusión que incluya 5 regiones en el extremo N de estas proteínas.

### **Ejemplo 7: Vacunación activa**

- La Figura 4 muestra los resultados de la inmunización activa con la proteína de fusión RibN-alfaN. (A) Inmunogenia de RibN-alfaN cuando se administra con o sin adyuvante. Se inmunizó a grupos de cuatro ratones con RibN-alfaN mezclado con CFA, alumbre o PBS, se administró un refuerzo después de 4 semanas y se sangró 2 semanas más tarde. Se analizó la reactividad del suero de ratón con el antígeno puro inmovilizado en pocillos de microvaloración. Se detectaron los anticuerpos unidos a ratones por incubación con Ig antirratón de conejo, seguido por proteína G radiomarcada. (B) Vacunación activa con RibN-alfaN. Se inmunizó a los ratones (número indicado en el eje y) con RibN-alfaN pura mezclada con alumbre, se administró un refuerzo después de 4 semanas y realizó una prueba de provocación 2 semanas más tarde con la cepa de tipo III que expresa Rib BM110 (izquierda) o la cepa de tipo la que expresa alfa A909 (derecha). Los ratones de control recibieron PBS y alumbre. Se agrupan los datos para la cepa alfa de dos experimentos. Los valores p se refieren a comparaciones a las 96 h.
- 20 En inmunizaciones activas con RibN-alfaN pura, esta proteína era igualmente inmunógena para los ratones cuando se administraba con CFA, alumbre o PBS (Figura 4A). Por otra parte, la inmunización activa con RibN-alfaN y alumbre protegía a los ratones contra cepas que expresan Rib y alfa (Figura 4B). Así, RibN-alfaN confirió inmunidad protectora con un adyuvante aceptado para uso humano.
- 25 Los anticuerpos producidos por RibN-alfaN eran casi exclusivamente de la clase IgG (datos no mostrados). Extrapolados a seres humanos, estos datos sugieren que un feto puede ser protegido por anticuerpos anti-(RibN-alfaN) maternos. Esta conclusión se ve avalada por el hallazgo de que los anticuerpos para Rib y alfa intactos son transferidos en la placenta humana.
- 30 En contraste con los resultados obtenidos con RibN-alfaN, la proteína Rib2R-alfa2R produjo anticuerpos en sólo uno de cuatro CFA ratones y no produjo anticuerpos en ratones que recibieron antígeno con alumbre o PBS (datos no mostrados). Así, Rib2R-alfa2R era poco inmunógena para ratones, aunque Rib y alfa intactas produjeron buenas respuestas inmunitarias a las repeticiones. Estos datos corroboran la conclusión de que RibN-alfaN tiene un interés especial como componente de una vacuna.

35

### **Ejemplo 8: Los anticuerpos para RibN-alfaN previenen la invasión de células epiteliales**

- La Figura 5 muestra que los anticuerpos para RibN-alfaN previenen la invasión de células epiteliales humanas. (A) Papel de Rib y alfa en invasión de células epiteliales. En un mutante negativo de Rib de cepa BM110 (izquierda) y en un mutante alfa-negativo de la cepa A909 (derecha) con la bacteria natural (WT) correspondiente se comparó la capacidad de invadir células de la línea de células cervicales humanas line ME180. (B) Inhibición de la invasión de células epiteliales por anti-(RibN-alfaN). Se preincubaron bacterias de cepa BM110 (izquierda) o A909 (derecha) con suero anti-(RibN-alfaN) de conejo o previo a la inmunización antes del uso en el ensayo de invasión. Todos los datos de los paneles (A) y (B) se basan en tres experimentos diferentes. Se indican los valores DT y p.
- 45 Se lavó un cultivo bacteriano producido durante toda la noche en PBS, se resuspendió en DME (suplementado con Hepes 10 mM y L-glutamina 4 mM) a  $1 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> y se añadió una muestra (500  $\mu$ l) a una monocapa de la línea de células cervicales humanas ME180 (ATCC HTB33), cultivada con una confluencia del 100% en un pocillo de una placa de 24 pocillos. Las bacterias añadidas estaban en un intervalo de  $6,7 \times 10^6$  UFC a  $2,7 \times 10^7$  UFC. El pocillo se centrifugó a 800 x g durante 10 min y se incubó durante 1 h a 37°C. Después de cinco lavados con PBS, se añadió DME (1 ml) que contenía gentamicina (500  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) y penicilina G (5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>), a cada pocillo y se continuó con la incubación durante 2 h. Después de 3 lavados con PBS, se separaron las células con tripsina-EDTA y se lisó con el 0,025% de Triton X-100, y se determinaron las bacterias intracelulares mediante siembra en placa. Para analizar la inhibición de la invasión por antisuero, se mezclaron las bacterias lavadas (500  $\mu$ l) con antisuero (50  $\mu$ l) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió la mezcla a una monocapa de ME180. Se determinó el número de UFC antes y después de la incubación con antisuero. A continuación se realizó el análisis tal como se describe anteriormente. Como control se usó suero de conejo previo a la inmunización. La fracción de bacterias que invadía ME180 en ausencia de antisuero fue del 0,13-0,37% del inóculo.

55

Los estudios en un modelo de han indicado que el EGB invade las células epiteliales durante una infección. Dado que alfa promueve la invasión de EGB *in vitro*, los autores de la invención compararon el papel de Rib y alfa en la invasión, usando mutantes EGB (Figura 5A). La invasión de células ME180 humanas se redujo 20 veces para la Rib mutante y 4 veces para la alfa mutante, en comparación con las cepas originales. Así, Rib y alfa comparten la capacidad de promover la invasión. Esta función potencialmente importante fue bloqueada de manera eficiente por anti-(RibN-alfaN) (Figura 5B). La reducción en la invasión se debió no sólo al agrupamiento bacteriano mediado por anticuerpos, que no se produjo en las condiciones usadas (datos no mostrados). Este resultado sugiere que anti-(RibN-alfaN) bloquea una función biológicamente importante.

10 Análisis estadístico. Los datos de las pruebas de protección de ratones se analizaron con prueba exacta de Fisher de 2 colas. El análisis de datos de las pruebas de invasión de células epiteliales se basó en la aproximación normal estándar de estimaciones de probabilidad máxima para dos variables independientes de distribución binomial. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con  $p < 0,05$ .

15 En resumen, estos ejemplos muestran que las regiones en el extremo N de Rib y alfa pueden usarse para obtener una vacuna de proteína de fusión que es superior a la obtenida de las repeticiones. Además, en lo que respecta a vacunas EGB humanas, los datos indican que la proteína de fusión RibN-alfaN puede conferir inmunidad protectora contra muchas cepas clínicamente importantes, incluida la mayoría de las cepas que provocan meningitis.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Gunnar Lindahl  
Lindahl, Gunnar

25 <120> Vacuna de proteína de fusión

<130> 202292

<160> 6

30

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 537

35 <212> ADN

<213> Streptococcus sp.

<400> 1

gggcccctgg gatccgctga agtaatttca ggaagtgctg ttacgttaaa cacaatatg	60
actaaaaatg ttcagaatgg tagagcatat atagatttat atgatgtgaa aatgggaaa	120
atagatccat tacaattaat tacgtttaat tcacctgatt taaaagctca gtatgtcatt	180
aggcaaggcg gcaattattt cacacaacct tctgaattga ctactgttgg tgcagctagt	240
attaattata cagtattgaa gacagatgga agtcctcata cgaagcctga tggacaagtg	300
gatattataa acgtttcatt gactatttac aattcttcag ctttgagaga taaaatagat	360
gaagttaaaa agaaagcggg agaccctaaa tgggacgagg gaagtcgcca taaagttttg	420
ataagtttag atgatatcaa aacagatatt gataataatc ctaagacgca atcagacatt	480
gccaataaaa taactgaagt tactaattta gaaaaaac tagtacctcg aatccca	537

40

<210> 2



ES 2 586 418 T3

<211> 179  
 <212> PRT  
 <213> Streptococcus sp.

5 <400> 2

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

<210> 3  
 10 <211> 525  
 <212> ADN  
 <213> Streptococcus sp.

<400> 3  
 15

ES 2 586 418 T3

```

gggcccctgg gatcctctac aattccaggg agtgcagcga ccttaaatac aagcatcact      60
aaaaatatac aaaacggaaa tgcttacata gatttatatg atgtaaaatt aggtaaaata      120
gatccattac aattaattgt tttagaacaa ggttttacag caaagtatgt ttttagacaa      180
ggtactaaat actatgggga tgtttctcag ttgcagagta caggaagggc tagtcttacc      240
tataatatat ttggtgaaga tggactacca catgtaaaga ctgatggaca aattgatata      300
gttagtgttg ctttaactat ttatgattca acaaccttga gggataagat tgaagaagtt      360
agaacgaatg caaacgatcc taagtggacg gaagaaagtc gtactgaggt tttaacagga      420
ttagatacaa ttaagacaga tattgataat aatcctaaga cgcaaacaga tattgatagt      480
aaaattgttg aggttaatga attagagaaa ttgttagtat tgtca                          525

```

<210> 4

<211> 175

5 <212> PRT

<213> Streptococcus sp.

<400> 4

```

Gly Pro Leu Gly Ser Ser Thr Ile Pro Gly Ser Ala Ala Thr Leu Asn
 1           5           10           15
Thr Ser Ile Thr Lys Asn Ile Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Ile Asp Leu
 20           25           30
Tyr Asp Val Lys Leu Gly Lys Ile Asp Pro Leu Gln Leu Ile Val Leu
 35           40           45

```

10

ES 2 586 418 T3

Glu Gln Gly Phe Thr Ala Lys Tyr Val Phe Arg Gln Gly Thr Lys Tyr  
50 55 60

Tyr Gly Asp Val Ser Gln Leu Gln Ser Thr Gly Arg Ala Ser Leu Thr  
65 70 75 80

Tyr Asn Ile Phe Gly Glu Asp Gly Leu Pro His Val Lys Thr Asp Gly  
85 90 95

Gln Ile Asp Ile Val Ser Val Ala Leu Thr Ile Tyr Asp Ser Thr Thr  
100 105 110

Leu Arg Asp Lys Ile Glu Glu Val Arg Thr Asn Ala Asn Asp Pro Lys  
115 120 125

Trp Thr Glu Glu Ser Arg Thr Glu Val Leu Thr Gly Leu Asp Thr Ile  
130 135 140

Lys Thr Asp Ile Asp Asn Asn Pro Lys Thr Gln Thr Asp Ile Asp Ser  
145 150 155 160

Lys Ile Val Glu Val Asn Glu Leu Glu Lys Leu Leu Val Leu Ser  
165 170 175

<210> 5

<211> 1053

5 <212> ADN

<213> Streptococcus sp.

<400> 5

ES 2 586 418 T3

gggcccctgg gatccgctga agtaatttca ggaagtgctg ttacgttaaa cacaaatag 60  
 actaaaaatg ttcagaatgg tagagcatat atagatttat atgatgtgaa aaatgggaaa 120  
 atagatccat tacaattaat tacgtttaat tcacctgatt taaaagctca gtatgtcatt 180  
 aggcaaggcg gcaattattht cacacaacct tctgaattga ctactgttgg tgcagctagt 240  
 attaattata cagtattgaa gacagatgga agtcctcata cgaagcctga tggacaagtg 300  
 gatattataa acgtttcatt gactattht ac aattcttcag ctttgagaga taaaatagat 360  
 gaagttaaaa agaaagcggg agaccctaaa tgggacgagg gaagtcgca taaagttttg 420  
 ataagtttag atgatatcaa aacagatatt gataataatc ctaagacgca atcagacatt 480  
 gccataaaa taactgaagt tactaattta gaaaaaac tagtacctcg aatcccagaa 540  
 ttctctacia ttccaggag tgcagcgacc ttaaatacaa gcatcactaa aaatatacaa 600  
 aacggaaatg cttacataga tttatatgat gtaaaattag gtaaaataga tccattacia 660  
 ttaattgttt tagaacaagg ttttacagca aagtatgttt ttagacaagg tactaaatac 720  
 tatgggatg tttctcagtt gcagagtaca ggaagggtca gtcttaccta taatatattht 780  
 ggtgaagatg gactaccaca tgtaaagact gatggacaaa ttgatatagt tagtgttgct 840  
 ttaactattht atgattcaac aaccttgagg gataagattg aagaagttag aacgaatgca 900  
  
 aacgatccta agtggacgga agaaagtcgt actgaggtht taacaggatt agatacaatt 960  
 aagacagata ttgataataa tcctaagacg caaacagata ttgatagtaa aattgttgag 1020  
 gttaatgaat tagagaaatt gttagtattg tca 1053

<210> 6

<211> 378

5 <212> PRT

<213> Streptococcus sp.

<400> 6

ES 2 586 418 T3

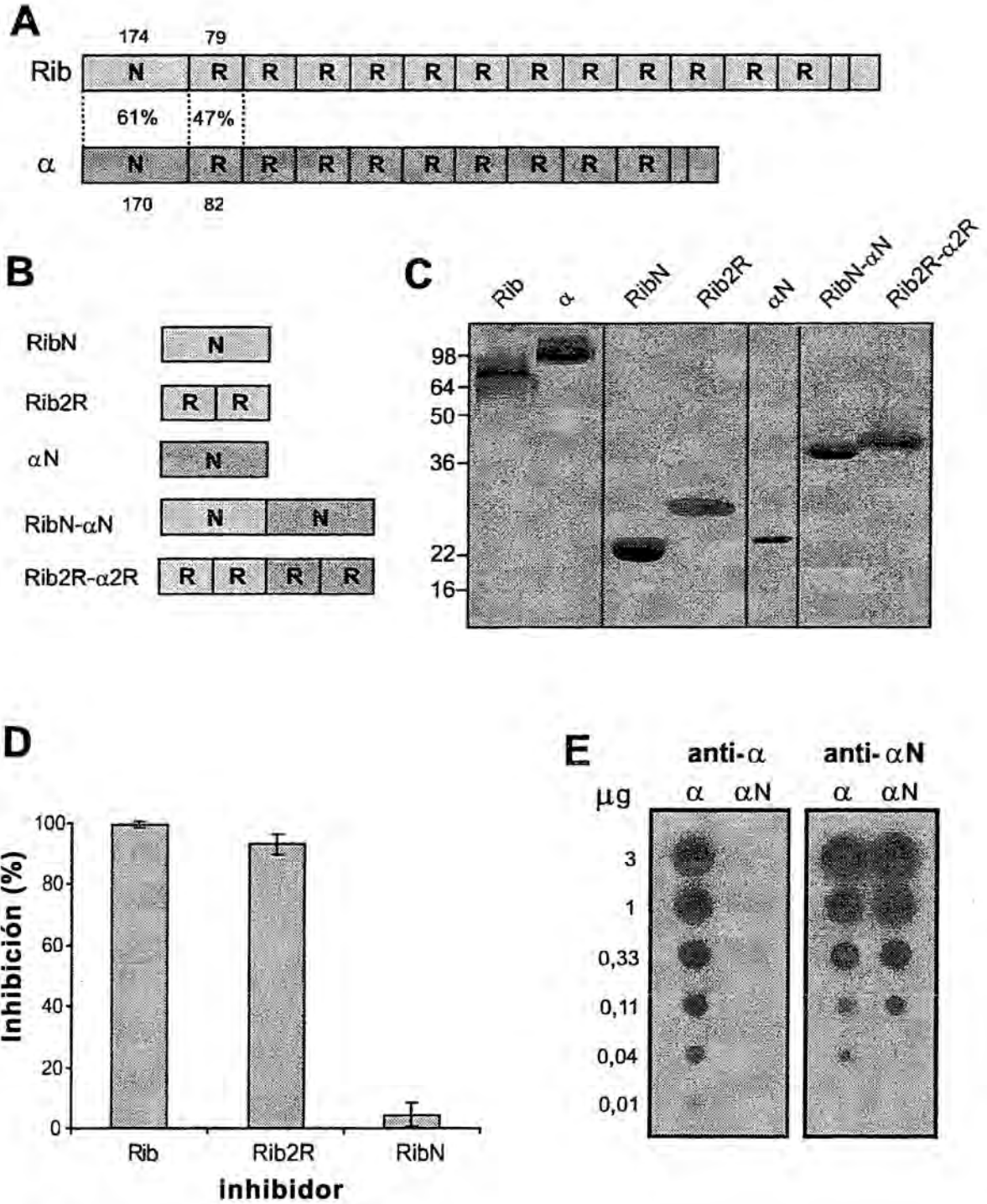
Gly Pro Leu Gly Ser Ala Ser Val Leu Ile Gly Ile Ser Phe Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gly Phe Thr Gln Gly Gln Phe Asn Ile Ser Thr Asp Thr Val Phe Ala  
 20 25 30  
 Ala Glu Val Ile Ser Gly Ser Ala Val Thr Leu Asn Thr Asn Met Thr  
 35 40 45  
 Lys Asn Val Gln Asn Gly Arg Ala Tyr Ile Asp Leu Tyr Asp Val Lys  
 50 55 60  
 Asn Gly Lys Ile Asp Pro Leu Gln Leu Ile Thr Leu Asn Ser Pro Asp  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Ala Gln Tyr Val Ile Arg Gln Gly Gly Asn Tyr Phe Thr Gln  
 85 90 95  
 Pro Ser Glu Leu Thr Thr Val Gly Ala Ala Ser Ile Asn Tyr Thr Val  
 100 105 110  
 Leu Lys Thr Asp Gly Ser Pro His Thr Lys Pro Asp Gly Gln Val Asp  
 115 120 125  
 Ile Ile Asn Val Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Ser Ser Ala Leu Arg Asp  
 130 135 140  
 Lys Ile Asp Glu Val Lys Lys Lys Ala Glu Asp Pro Lys Trp Asp Glu  
 145 150 155 160  
 Gly Ser Arg Asp Lys Val Leu Ile Ser Leu Asp Asp Ile Lys Thr Asp  
 165 170 175  
 Ile Asp Asn Asn Pro Lys Thr Gln Ser Asp Ile Ala Asn Lys Ile Thr  
 180 185 190  
 Glu Val Thr Asn Leu Glu Lys Ile Leu Val Pro Arg Ile Pro Glu Phe  
 195 200 205  
 Ser Thr Ile Pro Gly Ser Ala Ala Thr Leu Asn Thr Ser Ile Thr Lys

ES 2 586 418 T3

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

**REIVINDICACIONES**

1. Una proteína de fusión que comprende al menos dos secuencias de aminoácidos, donde dichas dos secuencias de aminoácidos consisten en una primera secuencia de aminoácidos que tiene  
5 al menos el 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, fusionada con una segunda secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 4, donde dicha proteína de fusión es capaz de conferir inmunidad protectora contra el estreptococo del grupo B.  
10
2. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha primera secuencia de aminoácidos tiene al menos el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 o donde dicha segunda secuencia de aminoácidos tiene al menos el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99% de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 4.  
15
3. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, donde la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6.  
20
4. La proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 3, donde la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 95% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6.
- 25 5. La proteína de fusión de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha proteína de fusión está modificada por glucosilación, amidación, carboxilación o fosforilación.
6. Una vacuna que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha composición de vacuna es capaz de conferir  
30 inmunidad protectora contra el estreptococo del grupo B que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. La vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende además un adyuvante.
8. La vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, donde dicha proteína de fusión se  
35 conjuga con un polisacárido para formar una vacuna conjugada.
9. Una secuencia de nucleótidos que comprende al menos la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 acoplada con la SEQ ID NO: 3 o la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.
- 40 10. La secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9, donde las SEQ ID NO: 1 y 3 están conectadas químicamente, conjugadas o reticuladas.
11. Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 9 a 10.
- 45 12. Una célula hospedadora que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 11.





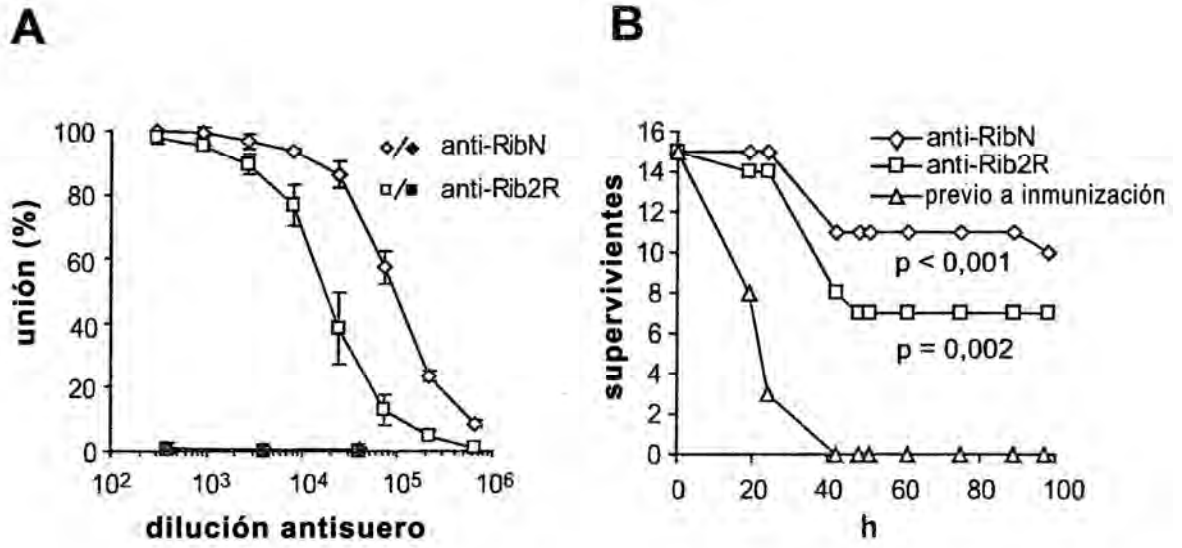


Fig. 2

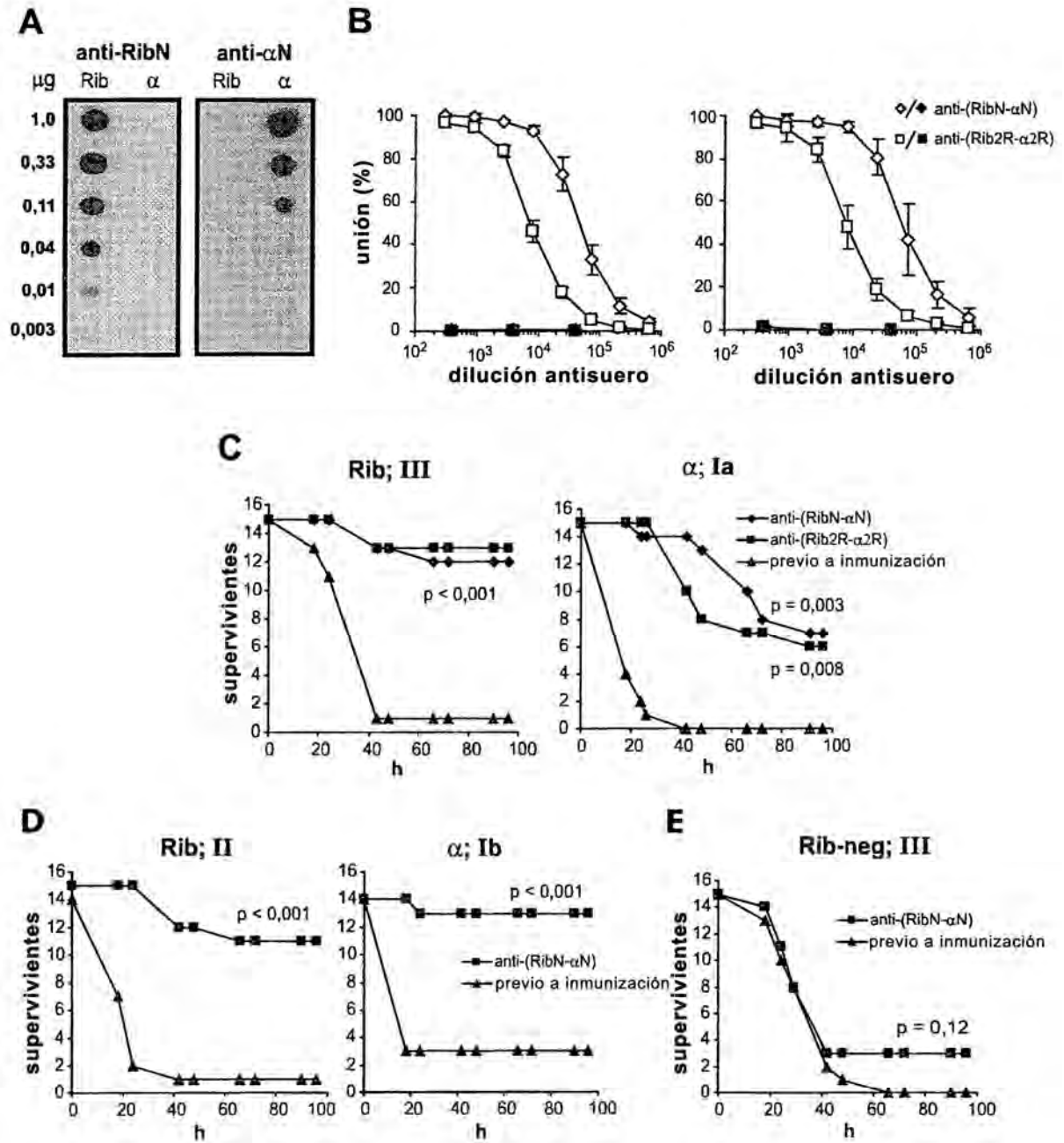


Fig. 3

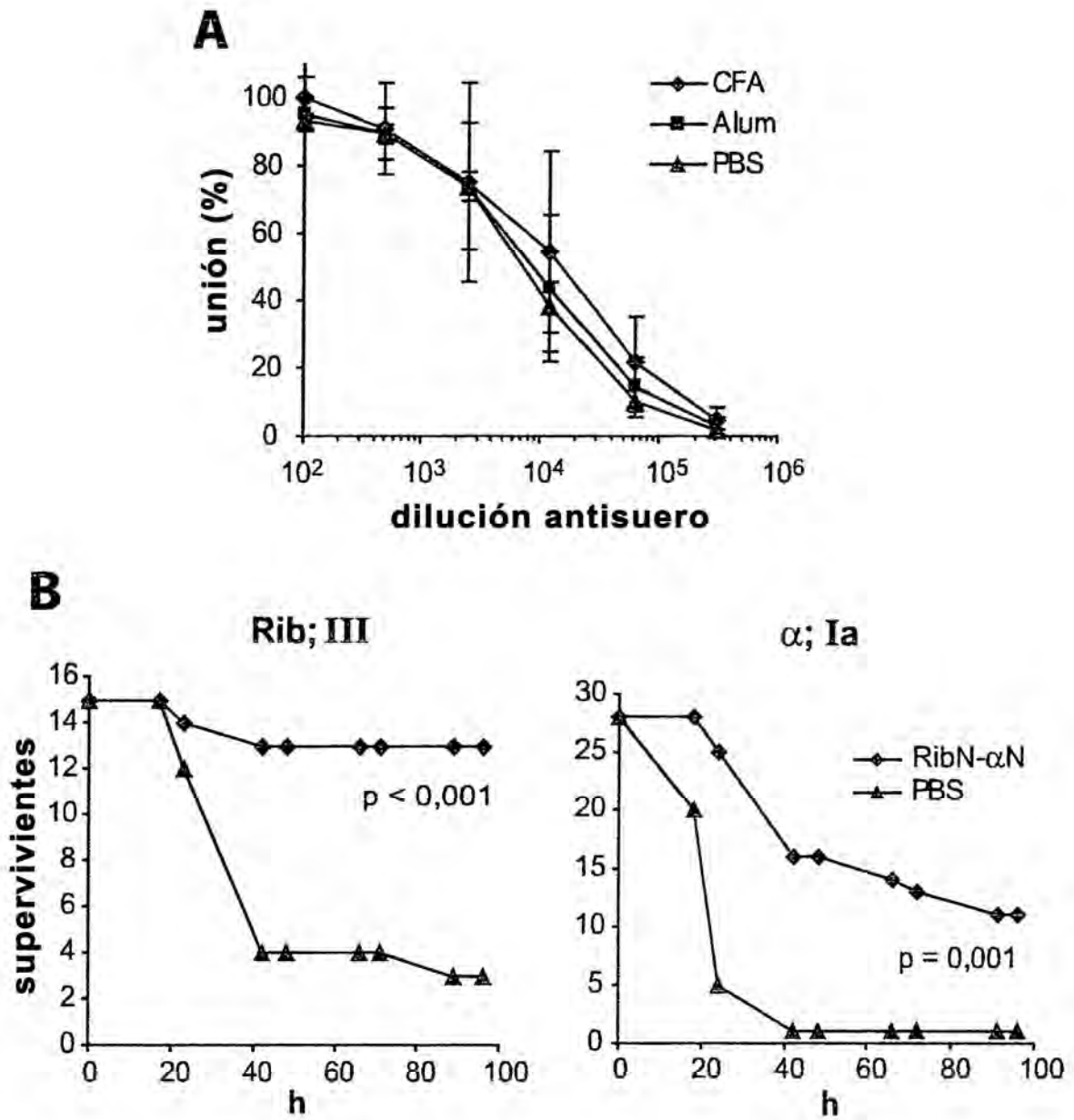


Fig. 4

