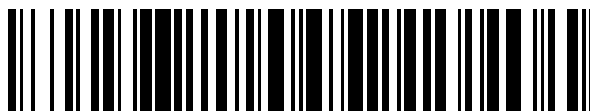


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 833**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.03.2014 PCT/PL2014/050018**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14209142**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2014 E 14722388 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 3014276**

54 Título: **Una prueba diagnóstica de infecciones por Streptococcus agalactiae**

30 Prioridad:

28.06.2013 PL 40449813

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

11.10.2018

73 Titular/es:

UNIWERSYTET JAGIELLONSKI (50.0%)

ul. Golebia 24

31-007 Krakow, PL y

INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII

DOSWIADCZALNEJ IM. LUDWIKI HIRSZFELDA

PAN (50.0%)

72 Inventor/es:

BRZYCHCZY-WLOCH, MONIKA;

GÓRSKA, SABINA;

BRZOWSKA, EWA;

GAMIAN, ANDRZEJ y

HECZKO, PIOTR

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 685 833 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

Una prueba diagnóstica de infecciones por *Streptococcus agalactiae*

- 5 El objeto de la invención es una prueba diagnóstica que permite la confirmación de infecciones por *Streptococcus agalactiae* en mujeres embarazadas. Utiliza una reacción específica de proteínas inmunorreactivas obtenidas de aislados clínicos de *Streptococcus agalactiae* con anticuerpos presentes en el suero de pacientes.
- 10 *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B, EGB), clasificado como serogrupo B de estreptococos, puede colonizar el aparato digestivo inferior, el ano y la vagina sin producir ningún síntoma de infección. Se confirmó que EGB está presente en la vagina o el recto en aproximadamente el 10-30% de las mujeres embarazadas. La colonización puede ser transitoria, crónica o intermitente. Sin embargo, la presencia de estreptococos del grupo B en la vagina en el embarazo es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de infecciones en los recién nacidos. Las infecciones intrauterinas se pueden producir en el curso del embarazo o bien a través de infección ascendente o debido a la aspiración de líquido amniótico infectado por el feto. Podrían inducir muerte fetal, neumonía neonatal, o septicemia. La colonización de un recién nacido también se puede producir durante el parto, pero en tales casos, con frecuencia solo hay colonización asintomática de la piel y membranas mucosas más que desarrollo de infección [1, 2, 3]. Según la Regulación del Ministro de Salud del 23 de septiembre de 2010 respecto a los estándares de conducta y procedimientos médicos mientras se proporcionan servicios de asistencia sanitaria que están dentro del ámbito del cuidado perinatal ejercido sobre mujeres durante embarazo fisiológico, parto fisiológico, puerperio y cuidado del lactante, todas las mujeres embarazadas se deben cribar para la presencia de estreptococos beta hemolíticos en el periodo entre las semanas 33 y 37 de gestación en frotis recogidos del vestíbulo de la vulva y el área anal [4]. La confirmación de la presencia de EGB es una indicación para la implementación de profilaxis antibiótica perinatal en la mujer afectada según las recomendaciones de la Sociedad Ginecológica Polaca de 2008 [5]. Además, a las mujeres embarazadas que desarrollaron una infección del aparato urinario con EGB o el análisis bacteriológico de su orina mostrara un resultado positivo para *Streptococcus agalactiae*, con un número igual a al menos 1×10^4 (ufc/ml, es decir, unidades formadoras de colinas) (la denominada bacteriuria asintomática) se les debe dar profilaxis antibiótica perinatal porque estas mujeres habitualmente muestran una colonización vaginal masiva con EGB, que aumenta significativamente el riesgo de desarrollo de septicemia neonatal temprana [1, 2, 5]. La solución propuesta, sin embargo, no es eficaz por completo, ya que no limita el desarrollo de infecciones en neonatos prematuros y no protege del desarrollo de infecciones posteriores que se desarrollan entre 7 días y 3 meses de edad. Además, cada vez con más frecuencia, el problema de las infecciones de etiología de EGB afecta a otros grupos de pacientes, especialmente pacientes inmunocomprometidos o geriátricos [1, 2, 6].
- 20
- 25
- 30
- 35 El diagnóstico rápido de infecciones producidas por EGB aseguraría la implementación inmediata de terapia de antibióticos, pero actualmente, en el mercado, no hay prueba diagnóstica que permita la confirmación de infección causada por *Streptococcus agalactiae*.
- 40 Hasta ahora, los métodos tradicionalmente empleados de diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* se han basado principalmente en el método de cultivo seguido por características fenotípicas (bioquímicas), serológicas o moleculares de los microorganismos aislados y cultivados. Los resultados obtenidos de estos métodos están disponibles después de varias horas como muy pronto, en el caso de PCR, o después de varios días cuando se trata de métodos convencionales de cultivo [1, 2, 5].
- 45 La invención desarrollada se refiere a una nueva prueba diagnóstica que permite la confirmación de infecciones por EGB en mujeres embarazadas, que utiliza una reacción específica de proteínas muy inmunorreactivas obtenidas de aislados de *Streptococcus agalactiae* con anticuerpos presentes en el suero de pacientes. La prueba innovadora se caracteriza por un tiempo de ensayo relativamente corto, alta sensibilidad y especificidad. Esta prueba es una alternativa a las soluciones actualmente usadas, tal como análisis bacteriológicos para carga de estreptococos del grupo B, basada en el método de cultivo, que constituye el llamado "criterio de referencia" que se caracteriza por baja sensibilidad y un largo tiempo (hasta varios días) que se debe esperar para el resultado y técnicas de biología molecular, incluyendo el método de PCR en tiempo real, que permite obtener el resultado rápidamente aunque es muy caro y requiere equipo especializado.
- 50
- 55 Todas las mujeres embarazadas son el grupo diana de nuestra prueba. El método desarrollado es adecuado para la aplicación en todos los laboratorios analíticos y/o microbiológicos ya que no requiere el uso de ningún equipo especial. Es posible extender la aplicación de este ensayo para detectar infecciones de etiología por EGB en otros grupos de pacientes (por ejemplo, neonatos, pacientes ambulatorios, pacientes de hospital) y en otros materiales clínicos (por ejemplo, plasma, líquido cefalorraquídeo).
- 60 Un ejemplo de una prueba conocida, el documento WO2009122388A1, es una prueba basada en el análisis del ácido nucleico de cepas de *Streptococcus agalactiae* aisladas de sangre, garganta, glándulas mamarias, nariz, o vagina de mujeres. En la prueba presente, la secuencia del marcador es un gen de EGB llamado *ssrA*.

Otra solución similar se describe en el documento US20040009574A1. La solución se refiere a la identificación de una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas responsables para la síntesis de polisacáridos capsulares que son específicos para cepas de *Streptococcus agalactiae*.

5 El documento US8137673B2 se dirige a la proteína y su secuencia de nucleótidos como un potencial portador de vacuna y un marcador diagnóstico para los grupos A y B de cepas de *Streptococcus*. La proteína de unión a fibronectina I es la proteína marcadora.

10 Otras potenciales proteínas marcadoras en infecciones por *Streptococcus agalactiae* pueden ser diferentes polipéptidos descritos en los documentos US7262024B2 y US20120141521A1.

15 Una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de: Seq. No. 1, Seq. No. 2, Seq. No. 3, Seq. No. 4 y los epítomos contenidos en las mismas se ha aislado favorablemente de una cepa de *Streptococcus agalactiae*, especialmente procedente de una muestra de sangre, orina, frotis vaginales, ano, oído, boca, contenidos bronquiales o líquido cefalorraquídeo obtenida de un paciente infectado con este patógeno.

20 El objeto de la invención es un método para detectar infección en un paciente con cepas de *Streptococcus agalactiae*, caracterizado en que una muestra del paciente se comprueba para la presencia de la proteína que contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de: Seq. Id. No. 1, Seq. Id. No. 2, Seq. Id. No. 3, Seq. Id. No. 4 y los epítomos contenidos en las mismas o de anticuerpos específicos para dicha proteína. La presencia de dicha proteína o de tales anticuerpos indica infección con cepas de *Streptococcus agalactiae* del paciente. Preferiblemente, la prueba se lleva a cabo usando métodos inmunoquímicos conocidos, especialmente inmunotransferencia o ELISA. Preferiblemente, se usa suero humano como la muestra de prueba, especialmente en una dilución de 500-10.000 veces.

25 Un objeto adicional de la invención es un uso de un kit que comprende la proteína como se ha definido anteriormente o anticuerpos específicos para dicha proteína para la detección de infección con cepas de *Streptococcus agalactiae*.

30 En la investigación sobre la identificación de proteínas inmunorreactivas que pertenecen a cepas de *Streptococcus agalactiae*, que producen infecciones en seres humanos, las proteínas de secuencias de aminoácidos marcadas con los números de identificación de NRID1, NRID2, NRID3 y NRID4 (Fig. 1) eran muy inmunorreactivas solo con sueros de individuos que experimentaron infección por EGB y portadores de bacterias *Streptococcus agalactiae*. No se observó reactividad similar para sueros de no portadores de estas cepas bacterianas.

35 El método revelado es una solución para el diagnóstico rápido, sensible y específico de infección causada por *Streptococcus agalactiae*. El enfoque en la prueba desarrollada es el uso de secuencias de aminoácidos muy inmunorreactivas (NRID1, NRID2, NRID3, NRID4) que pertenecen a proteínas de cepas de *Streptococcus agalactiae*, que son las proteínas sobre las que se produce la inducción de anticuerpos naturales durante el proceso de infección y cuyas secuencias pueden servir como marcadores para la identificación de estas infecciones en seres humanos. El uso de las secuencias de NRID1, NRID2, NRID3 y NRID4 no solo está limitado a la prueba diagnóstica misma, sino también, debido a sus propiedades inmunógenas, se pueden usar como portadores para vacunas contra infecciones por EGB. Los epítomos de las secuencias de NRID1, NRID2, NRID3 y NRID4 se pueden usar además para generar anticuerpos monoclonales muy específicos y para desarrollar una prueba diagnóstica incluso más rápida e igualmente precisa.

45 El método según la invención comprende métodos inmunoquímicos tal como inmunotransferencia, pero no está solo restringido a este método y puede incluir otras técnicas, tal como enzimoanálisis de adsorción (ELISA).

50 Para explicar la esencia de la invención mejor, la descripción se ha suplementado con las figuras adjuntas y los ejemplos presentados posteriormente.

La figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos de las proteínas inmunorreactivas de *Streptococcus agalactiae*.

55 La figura 2 muestra los resultados de un inmunoensayo de una reacción de anticuerpos de suero humano obtenidos de una mujer embarazada infectada con EGB (SB8) con proteínas de cepas de *Streptococcus agalactiae*, considerando la división en los grupos estudiados.

Ejemplo 1. La identificación de secuencias de aminoácidos muy inmunorreactivas que pertenecen a cepas de *Streptococcus agalactiae*

60 Las cepas clínicas de *Streptococcus agalactiae* se dividieron en cuatro grupos (Tabla 1):

Grupo 1 – cepas aisladas de la orina de neonatos con síntomas de infección del aparato urinario (14, 15, 18, 21, 27, 47, 54, 55, 56, 57)

65 Grupo 2 – cepas aisladas de la orina de pacientes adultos con síntomas de infección del aparato urinario (305167, 309192, d11, d12, d88, d96, d122, d147, d165)

Grupo 3 – cepas aisladas de sangre, oído o boca de neonatos con septicemia (4, 12, 13, 25, 26, 34, 35, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 50, 52, 53)

5 Grupo 4 – cepas de la carga de neonatos y mujeres embarazadas sin síntomas de infección con EGB y otras cepas de EGB (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 36, 39, 45, 46, 48, 49, 51, 58, 59, 60)

10 Tabla 1. Características de los aislados clínicos de *Streptococcus agalactiae* divididos en grupos de prueba (grupo 1, grupo 2, grupo 3) y un grupo control (grupo 4).

Número de aislado de EGB	Serotipo	Genes de la familia <i>Ajp</i>	Fenotipo de resistencia	Tipo ST	Material clínico	Síntomas clínicos
Grupo 1 – Cepas de <i>S. agalactiae</i> aisladas de neonatos con síntomas de infección del aparato urinario						
14	/5279/08	Ia	épsilon	-	-	Orina de recién nacido Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
15	/5303/08	Ia	épsilon	-	-	Orina de recién nacido Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
18	/13695/08	Ia	épsilon	-	-	Orina de recién nacido Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
21	/13608/08	Ib	bca	-	-	Orina de recién nacido Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
27	/9353/08	II	rib	-	-	Orina de recién nacido Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
47	/306723	III	alp2	-	ST-23	Orina de recién nacido Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
54	/1716/08	V	alp2	-	-	Orina de recién nacido Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
55	/1736/08	V	alp2	cMLS _B	-	Orina de recién nacido Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
56	/2992/08	V	rib	-	-	Orina de recién nacido Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
57	/13793/08	V	alp3	cMLS _B	-	Orina de recién nacido Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
Grupo 2 – Cepas de <i>S. agalactiae</i> aisladas de pacientes adultos con síntomas de infección del aparato urinario						
289370		II	rib	-	-	Orina-paciente adulto Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
305167		Ia	épsilon	-	-	Orina-paciente adulto Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
309192		II	bca	-	-	Orina-paciente adulto Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
d11		V	alp2	cMLS _B	-	Orina-paciente adulto Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
d12		III	rib	-	-	Orina-paciente adulto Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
d88		V	alp2	-	-	Orina-paciente adulto Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
d96		Ia	épsilon	-	-	Orina-paciente adulto Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
d122		Ib	bca	-	-	Orina-paciente adulto Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
d147		III	rib	cMLS _B	-	Orina-paciente adulto Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
d165		III	alp2/3	-	-	Orina-paciente adulto Bacteriuria (≥10 ⁵ ufc/ml)
Grupo 3 – Cepas de <i>S. agalactiae</i> aisladas de neonatos con septicemia						
4	/305245	II	bca	-	ST-106	Sangre neonatal venosa Septicemia del recién nacido (EOD)
12	/306735	Ia	épsilon	-	ST-23	Sangre neonatal venosa Septicemia del recién nacido (EOD)
13	/CM 169	Ia	bca	-	ST-220	Sangre neonatal venosa Septicemia del recién nacido (EOD)
25	/CM 47	II	rib	cMLS _B <i>ermB</i>	ST-19	Sangre neonatal venosa Septicemia del recién nacido (EOD)/muerte
34	/5886/09	III	rib	-	ST-17	Sangre neonatal venosa Septicemia del recién nacido (EOD)

ES 2 685 833 T3

35	/3634/08	III	rib	-	ST-17	Sangre venosa neonatal	Septicemia del recién nacido (EOD)
37	/L1-181	III	rib	-	ST-17	Sangre venosa neonatal	Septicemia del recién nacido (EOD)
38	/4504/08	III	rib	-	ST-19	Sangre venosa neonatal	Septicemia del recién nacido (EOD)
40	/W2/18	III	alp2	-	ST-23	Sangre venosa neonatal	Septicemia del recién nacido (EOD)
41	/CM 173	III	bca	cMLS _B <i>ermB</i>	ST-22	Frotis de boca de recién nacido	Septicemia del recién nacido (EOD)/muerte
42	/CM 176	III	rib	-	ST-220	Frotis de boca de recién nacido	Septicemia del recién nacido (EOD)/muerte
43	/CM 185	III	rib	iMLS _B	ST-410	Frotis de oído de recién nacido	Septicemia del recién nacido (EOD)
44	/CM 28	III	rib	-	ST-286	Sangre venosa neonatal	Septicemia del recién nacido (EOD)
50	/S1/4	V	alp3	-	ST-1	Sangre venosa neonatal	Septicemia del recién nacido (EOD)/muerte
52	/3514/08	V	rib	-	ST220	Sangre venosa neonatal	Septicemia del recién nacido (EOD)
53	/14030/08	V	rib	fenotipo M	ST-638	Sangre venosa neonatal	Septicemia del recién nacido (EOD)
Grupo 4 – Cepas de <i>S. agalactiae</i> de carga de recién nacidos y mujeres embarazadas sin síntomas de infección y otras cepas de EGB							
1	/7/P/2a	Ia	épsilon	-	-	Frotis vaginal – Mujer embarazada	Estado portador en embarazo
3	/28/0/3a	III	rib	-	-	Frotis anal – Mujer embarazada	Estado portador en embarazo
5	/3/P/2a	V	alp3	cMLS _B <i>ermB</i>	-	Frotis vaginal – Mujer embarazada	Estado portador en embarazo
6	/10/P/3a	II	rib	-	-	Frotis vaginal – Mujer embarazada	Estado portador en embarazo
7	/42/P/3a	V	alp2	-	-	Frotis vaginal – Mujer embarazada	Estado portador en embarazo
8	/9/0/2a	Ib	bca	-	-	Frotis anal – Mujer embarazada	Estado portador en embarazo
9	/14/P/3a	V	alp3	cMLS _B <i>ermB</i>	-	Frotis vaginal – Mujer embarazada	Estado portador en embarazo
10	/23/P/3a	II	rib	fenotipo M <i>mefA/E</i>	-	Frotis vaginal – Mujer embarazada	Estado portador en embarazo
11	/25/P/1a	Ia	épsilon	-	-	Frotis vaginal – Mujer embarazada	Estado portador en embarazo
16	/13445/07	Ia	épsilon	-	-	Frotis de boca de recién nacido	Colonización de neonato
17	/11277/08	Ia	rib	-	-	Frotis de oído de recién nacido	Colonización de neonato
19	/2337/08	Ia	épsilon	-	-	Frotis de boca de recién nacido	Colonización de neonato
20	/5338/08	Ia	-	-	-	Frotis de boca de recién nacido	Colonización de neonato
22	/D121	Ib	épsilon	-	-	Frotis cervical	Inflamación
23	/2107/08	Ib	bca	-	-	Frotis de boca de recién nacido	Colonización de neonato
24	/CM 184	Ib	bca	-	-	Frotis vaginal – Mujer embarazada	Colonización de neonato
28	/13640/07	II	bca	-	ST-10	Contenido bronquial de neonato	Neumonía
29	/14041/07	II	rib	-	-	Frotis de boca de recién nacido	Colonización de neonato
30	/14191/07	II	bca	-	-	Frotis de oído de recién nacido	Colonización de neonato

31	/2341/08	II	rib	-	-	Frotis de boca de recién nacido	Colonización de neonato
32	/D120	II	épsilon	fenotipo M <i>mefA/E</i>	-	Frotis vaginal	Inflamación
33	/D126	II	épsilon	-	-	Frotis vaginal	Inflamación
36	/13723/07	III	rib	-	ST-358	Frotis de oído de recién nacido	Colonización de neonato
39	/D136	III	épsilon	-	-	Frotis vaginal	Inflamación
45	/3A-012	III	rib	-	ST-447	Frotis vaginal – Mujer embarazada	Colonización de neonato
46	/CM49	III	rib	-	ST-148	Frotis vaginal – Mujer embarazada	Colonización de neonato
48	/CM 87	III	rib	-	ST-19	Frotis de oído de recién nacido	Colonización de neonato
49	/CM 3	IV	épsilon	-	-	Frotis vaginal – Mujer embarazada	Colonización de neonato
51	/D156	V	épsilon	-	-	Frotis vaginal	Inflamación
58	/104112	III	alp2	-	-	ATCC	Cepa de referencia
59	/2134	II	rib	-	-	DSM	Cepa de referencia
60	/10511	V	rib	-	-	ATCC	Cepa de referencia

Las cepas de *Streptococcus agalactiae* se cultivaron en medio sólido BHI en condiciones aerobias durante 24 h a 37°C. La masa celular después de centrifugación se suspendió en PBS a una concentración de A600 = 1,0. Después de la centrifugación el precipitado se resuspendió en tampón Tris (60 mM, pH 6,8) que contenía SDS al 2%. Las muestras se sonicaron después durante 5 minutos. El sobrenadante de proteína obtenido después de la centrifugación se precipitó con 3 volúmenes de etanol al 95% durante la noche a 4°C. Las muestras se centrifugaron y el precipitado se disolvió en agua. El método de ensayo BCA (llamado ensayo del ácido bicinónico) [7] sirvió para determinar la concentración de las proteínas aisladas.

10 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS según Laemmli [8].

La separación electroforética de proteínas se llevó a cabo según el método descrito por Laemmli (1970) [7] en gel concentrador al 5% y gel separador al 12,5%, en tampón de electrodo pH 8,6. Las muestras (10 µg) antes de la aplicación al gel (volumen máximo de 10 µl) se desnaturizaron durante 5 minutos en un baño caliente hirviendo. La separación de proteínas se llevó a cabo durante aproximadamente 80 minutos, inicialmente al amperaje de 10 mA en cada placa con dimensiones de 83 x 73 x 0,75 mm, y 20 mA después de la entrada en el gel concentrador. La electroforesis se llevó a cabo en kit Mini PROTEAN® 3 Cell de Bio-Rad para electroforesis. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron durante 30 minutos en azul brillante de Coomassie R-250 al 0,1% (v/v) en metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v).

20 Inmunotransferencia [9]

El gel después de la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS se transfirió a tampón Tris/Gly con metanol al 10% (v/v) de pH 8,3 (tampón de transferencia) durante 15 minutos. La membrana, Immobilon-P (PVDF por Millipore), se empapó durante 15 segundos en MeOH al 100%, 2 minutos en agua Milli-Q y 2 minutos en tampón de transferencia. La transferencia se realizó durante 1 h a 100 V usando el kit de Bio-Rad. Después de la transferencia la membrana se tiñó con rojo Ponceau S y después el exceso de colorante se destiñó en agua Milli-Q. La inmunotransferencia se realizó con proteínas unidas en una membrana de Immobilon-P hidrofóbica. Los sitios libres en la membrana se bloquearon con seroalbúmina bovina (BSA) al 1% en tampón Tris/HCl pH 7,5 que contenía NaCl 50 mM y Tween-20 al 0,05% (tampón TBS-T) durante 1 h a 37°C. El exceso de BSA se lavó con TBS-T, 1 x 15 minutos y 2 veces durante 5 minutos. Posteriormente, la reacción se realizó con 24 sueros humanos (incluyendo 16 sueros que venían de mujeres embarazadas con carga de EGB y pacientes con infección; 8 sueros constituyeron control y venían de mujeres embarazadas que no eran portadoras de EGB), diluidos en el intervalo de 500-10.000 veces en TBS-T con BSA al 1% durante 2 h a 37°C con agitación. El exceso de anticuerpos no unidos se lavó con TBS-T. La siguiente fase del experimento fue la reacción con anticuerpos marcados con enzima -fosfatasa alcalina- en TBS-T durante 1 h a 37°C suplementado con suero de cabra al 5% (v/v). El exceso de conjugado se lavó con TBS-T (1 x 15 minutos, 4 veces durante 5 minutos). La imagen se desarrolló usando sustratos para fosfatasa alcalina: NBT (nitrotetrazol), BCIP (fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo) en tampón TBS con la adición de iones Mg²⁺, pH 9,5. Después de obtener la imagen (después de aproximadamente 15-20 segundos) la reacción se terminó transfiriendo la membrana a agua Milli-Q.

Resultados

45 Como resultado de los experimentos realizados se obtuvo la imagen de las proteínas inmunógenas de cepas de *Streptococcus agalactiae*. Las imágenes de proteínas reactivas de las cepas ensayadas se diferenciaban entre sí, y un análisis más detallado reveló la correlación entre el material clínico y la reactividad con los sueros. Se ha encontrado que todas las cepas aisladas de la orina de neonatos (14, 15, 18, 21, 27, 47, 54, 55, 56, 57) y de orina de pacientes

adultos (305167, 309192, d11, d12, d88, d96, d122, d147, d165) producen proteínas en el intervalo de 35-50 kDa que reaccionan con todos los sueros investigados originarios de mujeres con carga de EGB y con infección, pero no reaccionan con sueros del grupo control.

5 Posteriormente están los resultados del inmunoensayo de la reacción de anticuerpos de suero humano obtenidos de una mujer embarazada infectada con EGB (número de muestra SB8) con proteínas de cepas de *Streptococcus agalactiae* incluyendo la división en los grupos estudiados del aislado (Fig. 2).

10 Las proteínas en el intervalo de 35-50 kDa mostraron reactividad con anticuerpos en los sueros de pacientes con infecciones por *Streptococcus agalactiae*, pero no reaccionaron con los sueros obtenidos de sujetos sanos que no eran portadores de EGB. Las proteínas seleccionadas reaccionaron distintivamente y se pueden usar en inmunoensayos, tal como inmunotransferencia, ELISA, EIA en mancha, para la detección de infecciones por *S. agalactiae*.

15 Las proteínas descritas anteriormente se aislaron y sus secuencias de aminoácidos se determinaron. Identificadas de tal manera, se muestran secuencias de aminoácidos muy reactivas que pertenecen a las proteínas de cepas de *Streptococcus agalactiae* en la lista de secuencias adjunta como Seq. No. 1, Seq. No. 2, Seq. No. 3 y Seq. No. 4.

20 Ejemplo 2. Prueba diagnóstica de infecciones por *Streptococcus agalactiae*

Una forma de realización ejemplar de la invención comprende las siguientes etapas:

- 25 a) Las membranas de PVDF preparadas de 0,45 µm de espesor que contienen las secuencias inmunorreactivas separadas de proteínas de cepas de *Streptococcus agalactiae* según la invención (Seq. Id. No. 1 a 4) se empapan en metanol, se lavan y someten a reacción de bloqueo de los sitios libres usando un agente de bloqueo, preferiblemente BSA al 0,5-5,0% en tampón fosfato. Al mismo tiempo la membrana se obtiene realizando una transferencia de las secuencias de proteínas de EGB separadas de gel de poliacrilamida, lo más preferiblemente del 7,5-15%, se seca y almacena en la oscuridad.
- 30 b) La membrana de PVDF preparada se incuba con suero humano diluido 500-10.000 veces, se incuba en un agitador rotatorio a 37°C durante 1 h, el exceso de anticuerpos se lava con tampón fosfato y detergente, preferiblemente Tween-20 en una concentración de 0,01-0,5%.
- c) La reacción de las secuencias inmunorreactivas se realiza en la membrana de PVDF con anticuerpos anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina a una dilución de 500-10.000 veces en un agitador rotatorio a 37°C durante 1 h, el exceso de conjugado se lava con tampón fosfato con Tween-20.
- 35 d) Visualización de prueba usando sustratos para fosfatasa alcalina.

Referencias:

- 40 1. Schrag S, et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. MMWR 2002; 15: 1-22.
2. Verani J, et al. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. Revised Guidelines from CDC, 2010. MMWR 2010; 59: 1-32.
- 45 3. Rodriguez-Granger J, et al. Prevention of group B streptococcal neonatal disease revisited. The DEVANI European project. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31: 2097-104.
4. Regulation of the Minister of Health of 23 September 2010 Annex to Regulation —Standards of conduct and medical procedures while providing health care services which fall within the scope of perinatal care exercised over women during physiological pregnancy, physiological childbirth, puerperium and infant care. 2010; 1-27.
- 50 5. Kotarski J, et al. Recommendations of the Polish Gynecological Society concerning the detection of group B streptococci (GBS) carriage in pregnant women and the prevention of infections in newborns. Ginekol Pol 2008; 79: 221-3.
6. Edwards MS, Baker CJ. Group B Streptococcal infections in elderly adults. Clin Infect Dis 2005;41:839-847.
7. Smith PK, et al. Measurement of protein using bincichoninic acid. Anal. Biochem. 1985; 150: 76-85
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-5.
- 55 9. Towbin., T. Staechelin., J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to ultracellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1979; 4350-4354.

Lista de secuencias

- 60 <110> Uniwersytet Jagielloński
- <120> Una prueba diagnóstica de infecciones por *Streptococcus agalactiae*
- 65 <130> PZ/2033/RW/PCT

ES 2 685 833 T3

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Streptococcus agalactiae

10 <400> 1
 Met Ser Thr Ser Phe Glu Asn Lys Ala Thr Asn Arg Gly Ile Ile Thr
 1 5 10 15
 Phe Thr Ile Ser Gln Asp Glu Ile Lys Pro Ala Leu Asp Gln Ala Phe
 20 25 30
 Asn Lys Val Lys Lys Asp Leu Asn Val Pro Gly Phe Arg Lys Gly His
 35 40 45
 Met Pro Arg Thr Val Phe Asn Gln Lys Phe Gly Glu Glu Ala Leu Tyr
 50 55 60
 Glu Asn Ala Leu Asn Leu Val Leu Pro Lys Ala Tyr Glu Ala Ala Val
 65 70 75 80
 Ala Glu Leu Gly Leu Asp Val Val Ala Gln Pro Lys Ile Asp Val Val
 85 90 95
 Ser Met Glu Lys Gly Gln Asp Trp Lys Leu Thr Ala Glu Val Val Thr
 100 105 110
 Lys Pro Glu Val Lys Leu Gly Asp Tyr Lys Asp Leu Ser Val Glu Val
 115 120 125
 Asp Ala Ser Lys Glu Val Ser Asp Glu Glu Val Asp Ala Lys Val Glu
 130 135 140
 Arg Glu Arg Asn Asn Leu Ala Glu Leu Thr Val Lys Asp Gly Glu Ala
 145 150 155 160
 Ala Gln Gly Asp Thr Val Val Ile Asp Phe Val Gly Ser Val Asp Gly
 165 170 175

ES 2 685 833 T3

Val Glu Phe Asp Gly Gly Lys Gly Asp Asn Phe Ser Leu Glu Leu Gly
 180 185 190

Ser Gly Gln Phe Ile Pro Gly Phe Glu Glu Gln Leu Val Gly Ser Lys
 195 200 205

Ala Gly Gln Thr Val Asp Val Asn Val Thr Phe Pro Glu Asp Tyr Gln
 210 215 220

Ala Glu Asp Leu Ala Gly Lys Asp Ala Lys Phe Val Thr Thr Ile His
 225 230 235 240

Glu Val Lys Thr Lys Glu Val Pro Ala Leu Asp Asp Glu Leu Ala Lys
 245 250 255

Asp Ile Asp Asp Glu Val Glu Thr Leu Asp Glu Leu Lys Ala Lys Tyr
 260 265 270

Arg Lys Glu Leu Glu Ser Ala Lys Glu Ile Ala Phe Asp Asp Ala Val
 275 280 285

Glu Gly Ala Ala Ile Glu Leu Ala Val Ala Asn Ala Glu Ile Val Glu
 290 295 300

Leu Pro Glu Glu Met Val His Asp Glu Val His Arg Ala Met Asn Glu
 305 310 315 320

Phe Met Gly Asn Met Gln Arg Gln Gly Ile Ser Pro Glu Met Tyr Phe
 325 330 335

Gln Leu Thr Gly Thr Thr Glu Glu Asp Leu His Lys Gln Tyr Gln Ala
 340 345 350

Asp Ala Asp Lys Arg Val Lys Thr Asn Leu Val Ile Glu Ala Ile Ala
 355 360 365

Ala Ala Glu Gly Phe Glu Ala Thr Asp Glu Glu Ile Glu Lys Glu Ile
 370 375 380

Thr Asp Leu Ala Ser Glu Tyr Asn Met Glu Ala Asp Gln Val Arg Gly
 385 390 395 400

Leu Leu Ser Ala Asp Met Leu Lys His Asp Ile Ala Met Lys Lys Ala
 405 410 415

Val Asp Val Ile Thr Ser Ser Ala Thr Val Lys
 420 425

<210> 2
 <211> 435

ES 2 685 833 T3

<212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae

<400> 2

```

Met Ser Ile Ile Thr Asp Val Tyr Ala Arg Glu Val Leu Asp Ser Arg
 1           5           10           15

Gly Asn Pro Thr Leu Glu Val Glu Val Tyr Thr Glu Ser Gly Ala Phe
      20           25           30

Gly Arg Gly Met Val Pro Ser Gly Ala Ser Thr Gly Glu His Glu Ala
      35           40           45

Val Glu Leu Arg Asp Gly Asp Lys Ser Arg Tyr Gly Gly Leu Gly Thr
      50           55           60

Gln Lys Ala Val Asp Asn Val Asn Asn Val Ile Ala Glu Ala Ile Ile
65           70           75           80

Gly Tyr Asp Val Arg Asp Gln Gln Ala Ile Asp Arg Ala Met Ile Ala
      85           90           95

Leu Asp Gly Thr Pro Asn Lys Gly Lys Leu Gly Ala Asn Ala Ile Leu
      100          105          110

Gly Val Ser Ile Ala Val Ala Arg Ala Ala Ala Asp Tyr Leu Glu Val
      115          120          125

Pro Leu Tyr Ser Tyr Leu Gly Gly Phe Asn Thr Lys Val Leu Pro Thr
      130          135          140

Pro Met Met Asn Ile Ile Asn Gly Gly Ser His Ser Asp Ala Pro Ile
145          150          155          160

Ala Phe Gln Glu Phe Met Ile Met Pro Val Gly Ala Pro Thr Phe Lys
      165          170          175

Glu Ala Leu Arg Trp Gly Ala Glu Val Phe His Ala Leu Lys Lys Ile
      180          185          190

Leu Lys Glu Arg Gly Leu Glu Thr Ala Val Gly Asp Glu Gly Gly Phe
      195          200          205

Ala Pro Lys Phe Glu Gly Thr Glu Asp Gly Val Glu Thr Ile Leu Lys
      210          215          220

```

ES 2 685 833 T3

Ala Ile Glu Ala Ala Gly Tyr Glu Ala Gly Glu Asn Gly Ile Met Ile
 225 230 235 240

Gly Phe Asp Cys Ala Ser Ser Glu Phe Tyr Asp Ala Glu Arg Lys Val
 245 250 255

Tyr Asp Tyr Gly Lys Phe Glu Gly Glu Gly Gly Ala Val Arg Thr Ala
 260 265 270

Ala Glu Gln Ile Asp Tyr Leu Glu Glu Leu Val Asn Lys Tyr Pro Ile
 275 280 285

Ile Thr Ile Glu Asp Gly Met Asp Glu Asn Asp Trp Asp Gly Trp Lys
 290 295 300

Ala Leu Thr Glu Arg Leu Gly Gly Arg Val Gln Leu Val Gly Asp Asp
 305 310 315 320

Phe Phe Val Thr Asn Thr Asp Tyr Leu Ala Arg Gly Ile Lys Glu Glu
 325 330 335

Ala Ala Asn Ser Ile Leu Ile Lys Val Asn Gln Ile Gly Thr Leu Thr
 340 345 350

Glu Thr Phe Glu Ala Ile Glu Met Ala Lys Glu Ala Gly Tyr Thr Ala
 355 360 365

Val Val Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu Asp Ser Thr Ile Ala Asp
 370 375 380

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

Arg Thr Asp Arg Ile Ala Lys Tyr Asn Gln Leu Leu Arg Ile Glu Asp
 405 410 415

Gln Leu Gly Glu Val Ala Gln Tyr Lys Gly Ile Lys Ser Phe Tyr Asn
 420 425 430

Leu Lys Lys
 435

- 5 <210> 3
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Streptococcus agalactiae
 <400> 3

ES 2 685 833 T3

Met Ala Tyr Lys Thr Ile Tyr Pro Tyr Thr Asn Glu Val Leu His Glu
 1 5 10 15

Phe Asp Asn Ile Ser Asp Ser Asp Leu Glu Gln Ser Leu Asp Ile Ala
 20 25 30

His Ala Leu Tyr Lys Thr Trp Arg Lys Glu Asp Asn Val Glu Glu Arg
 35 40 45

Gln Asn Gln Leu His Lys Val Ala Asp Leu Leu Arg Lys Asp Arg Asp
 50 55 60

Lys Tyr Ala Glu Val Met Thr Lys Asp Met Gly Lys Leu Phe Thr Glu
 65 70 75 80

Ala Gln Gly Glu Val Asp Leu Cys Ala Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Ala
 85 90 95

Asp Asn Gly Gln Lys Phe Leu Lys Pro Val Pro Leu Glu Ser Pro Asn
 100 105 110

Gly Glu Ala Tyr Tyr Leu Lys Gln Ala Val Gly Val Leu Leu Ala Val
 115 120 125

Glu Pro Trp Asn Phe Pro Phe Tyr Gln Ile Met Arg Val Phe Ala Pro
 130 135 140

Asn Phe Ile Val Gly Asn Thr Met Leu Leu Lys His Ala Ser Ile Cys
 145 150 155 160

Pro Ala Ser Ala Gln Ala Phe Glu Asp Leu Val Arg Glu Ala Gly Ala
 165 170 175

Pro Glu Gly Ala Phe Lys Asn Ile Phe Ala Ser Tyr Asp Gln Val Ser
 180 185 190

Asn Leu Ile Ser Asp Pro Arg Val Ala Gly Val Cys Leu Thr Gly Ser
 195 200 205

Glu Arg Gly Gly Ala Ser Ile Ala Ala Glu Ala Gly Lys Asn Leu Lys
 210 215 220

Lys Ser Ser Met Glu Leu Gly Gly Asn Asp Ala Phe Leu Ile Leu Asp
 225 230 235 240

Asp Ala Asp Phe Asp Leu Leu Ser Lys Thr Ile Phe Phe Ala Arg Leu
 245 250 255

ES 2 685 833 T3

Tyr Asn Ala Gly Gln Val Cys Thr Ser Ser Lys Arg Phe Ile Val Met
260 265 270

Ala Asp Lys Tyr Asp Glu Phe Val Asn Met Val Val Glu Thr Phe Lys
275 280 285

Ser Ala Lys Trp Gly Asp Pro Met Asp Ser Glu Thr Thr Leu Ala Pro
290 295 300

Leu Ser Ser Ala Gly Ala Lys Asp Asp Val Leu Lys Gln Ile Lys Leu
305 310 315 320

Ala Val Asp His Gly Ala Glu Val Val Phe Gly Asn Asp Thr Ile Asp
325 330 335

His Pro Gly Asn Phe Val Met Pro Thr Val Leu Thr Asn Ile Thr Lys
340 345 350

Ala Asn Pro Ile Tyr Asn Gln Glu Ile Phe Gly Pro Val Ala Ser Ile
355 360 365

Tyr Lys Val Asp Thr Glu Glu Glu Ala Ile Ala Leu Ala Asn Asp Ser
370 375 380

Ser Tyr Gly Leu Gly Ser Thr Val Phe Ser Ser Asp Pro Glu His Ala
385 390 395 400

Lys Lys Val Ala Ala Gln Ile Glu Thr Gly Met Thr Phe Ile Asn Ser
405 410 415

Gly Trp Thr Ser Leu Pro Glu Leu Pro Phe Gly Gly Ile Lys Asn Ser
420 425 430

Gly Tyr Gly Arg Glu Leu Ser Gln Leu Gly Phe Asp Ala Phe Val Asn
435 440 445

Glu His Leu Val Phe Thr Pro Asn Ser Asp
450 455

<210> 4

<211> 398

5 <212> PRT

<213> Streptococcus agalactiae

<400> 4

Met Ala Lys Glu Lys Tyr Asp Arg Ser Lys Pro His Val Asn Ile Gly
1 5 10 15

ES 2 685 833 T3

Thr Ile Gly His Val Asp His Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Ala Ile
 20 25 30
 Thr Thr Val Leu Ala Arg Arg Leu Pro Thr Ser Val Asn Gln Pro Lys
 35 40 45
 Asp Tyr Ala Ser Ile Asp Ala Ala Pro Glu Glu Arg Glu Arg Gly Ile
 50 55 60
 Thr Ile Asn Thr Ala His Val Glu Tyr Glu Thr Glu Lys Arg His Tyr
 65 70 75 80
 Ala His Ile Asp Ala Pro Gly His Ala Asp Tyr Val Lys Asn Met Ile
 85 90 95
 Thr Gly Ala Ala Gln Met Asp Gly Ala Ile Leu Val Val Ala Ser Thr
 100 105 110
 Asp Gly Pro Met Pro Gln Thr Arg Glu His Ile Leu Leu Ser Arg Gln
 115 120 125
 Val Gly Val Lys His Leu Ile Val Phe Met Asn Lys Val Asp Leu Val
 130 135 140
 Asp Asp Glu Glu Leu Leu Glu Leu Val Glu Met Glu Ile Arg Asp Leu
 145 150 155 160
 Leu Ser Glu Tyr Asp Phe Pro Gly Asp Asp Leu Pro Val Ile Gln Gly
 165 170 175
 Ser Ala Leu Lys Ala Leu Glu Gly Asp Glu Lys Tyr Glu Asp Ile Ile
 180 185 190
 Met Glu Leu Met Ser Thr Val Asp Glu Tyr Ile Pro Glu Pro Glu Arg
 195 200 205
 Asp Thr Asp Lys Pro Leu Leu Leu Pro Val Glu Asp Val Phe Ser Ile
 210 215 220
 Thr Gly Arg Gly Thr Val Ala Ser Gly Arg Ile Asp Arg Gly Thr Val
 225 230 235 240
 Arg Val Asn Asp Glu Val Glu Ile Val Gly Ile Lys Glu Asp Ile Gln
 245 250 255
 Lys Ala Val Val Thr Gly Val Glu Met Phe Arg Lys Gln Leu Asp Glu

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para detectar infección en pacientes con cepas de *Streptococcus agalactiae*, caracterizado en que una muestra del paciente se comprueba para la presencia de la proteína que contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre: Seq. Id. No. 1, Seq. Id. No. 3, Seq. Id. No. 4 y los epítomos contenidos en las mismas o de anticuerpos específicos para dicha proteína, en donde la presencia de dicha proteína o de tales anticuerpos indica infección del paciente con cepas de *Streptococcus agalactiae*.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde la prueba se lleva a cabo usando métodos inmunoquímicos conocidos, especialmente inmunotransferencia o ELISA.
3. El método según la reivindicación 1, en donde se usa una muestra de prueba de suero humano, especialmente en una dilución de 500-10.000 veces.
- 15 4. Un uso de un kit que comprende la proteína que contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre: Seq. Id. No. 1, Seq. Id. No. 3, Seq. Id. No. 4 y los epítomos contenidos en las mismas o de anticuerpos específicos para dicha proteína para la detección in vitro de infección con cepas de *Streptococcus agalactiae*.

ES 2 685 833 T3

Seq. Id. No. 1

MSTSFENKAT NRGHITFTIS QDEIKPALDQ AFNKVKKDLN VPGFRKGHMP
RTVFNQKFGE EALYENALNL VLPKAYEAAV AELGLDVVAQ PKIDVVSMEK
GQDWKLTAEV VTKPEVKLGD YKDLSVEVDA SKEVSDEEVD AKVERERNL
AELTVKDGEA AQGDTVVIDF VGSVDGVEFD GKGDNFSLE LGSGQFIPGF
EEQLVGSKAG QTVDVNVTFP EDYQAEDLAG KDAKFVTTIH EVKTKEVPAL
DDELAKDIDD EVETLDELKA KYRKELESAK EIAFDDAVEG AAIELAVANA
EIVELPEEMV HDEVHRAMNE FMGNMQRQGI SPEMYFQLTG TTEEDLHKQY
QADADKRVKT NLVIEAIAAA EGFEATDEEI EKEITDLASE YNMEADQVRG
LLSADMLKHD IAMKKAVDVI TSSATVK

Seq. Id. No. 2

MSIITDVYAR EVLDSRGNPT LEVEVYTESG AFGRGMVPSG ASTGEHEAVE
LRDGDKSRYG GLGTQKAVDN VNNVIAEAI GYDVRDQQAI DRAMIALDGT
PNKGGKLGANA ILGVSIAMVAR AAADYLEVPL YSYLGGFNTK VLPTPMMNII
NGGSHSDAPI AFQEFMIMPV GAPTKEALR WGAEVPHALK KILKERGLET
AVGDEGGFAP KFEGTEDGVE TILKAIEAAG YEAGENGIMI GFDCASSEFY
DAERKVYDYG KFEGEGGAVR TAAEQIDYLE ELVNKYPIIT IEDGMDENDW
DGWKALTERL GGRVQLVGDD FVTNTDYL RGIKEEAANS ILIKVNQIGT
LTETFEAIEM AKEAGYTAVV SHRSGETEDS TIADIAVATN AGQIKTGSL
RTDRIAKYNQ LLRIEDQLGE VAQYKGIKSF YNLKK

Seq. Id. No. 3

MAYKTIYPYT NEVLHEFDNI SDSLEQLSD IAHALYKTWR KEDNVEERQN
QLHKVADLLR KDRDKYAEVM TKDMGKLFTE AQGEVDLCAD IADYYADNGQ
KFLKPVPLES PNGEAYYLKQ AVGVLLAVEP WNFPPYQIMR VFAPNFIVGN
TMLLKHASIC PASAQAFEDL VREAGAPEGA FKNIFASYDQ VSNLISDPRV
AGVCLTGSER GGASIAAEAG KNLKSSMEL GGND AFLILD DADFDLLSKT
IFFARLYNAG QVCTSSKRFI VMADKYDEFV NMVVETFKSA KWGDPMDSET
TLAPLSSAGA KDDVLKQIKL AVDHGAEVVF GNDTIDHPGN FVMPTVLTNI
TKANPIYNQE IFGPVASIYK VDTEEEAIAL ANDSSYGLGS TVFSSDPEHA
KKVAAQIETG MTFINSGWTS LPELPGGKIK NSGYGRELSQ LGFDAFVNEH
LVFTPNSD

Seq. Id. No. 4

MAKEKYDRSK PHVNIGTIGH VDHGKTTLTA AITTVLARRL PTSVNQPKDY
ASIDAAPeer ERGITINTAH VEYETEKRHY AHIDAPGHAD YVKNMITGAA
QMDGAILVVA STDGPMPQTR EHILLSRQVG VKHLIVFMNK VDLVDDEELL
ELVEMEIRDL LSEYDFPGDD LPVIQGSALK ALEGDEKYED IIMELMSTVD
EYIPEPERDT DKPLLLPVED VFSITGRGTV ASGRIDRGTV RVNDEVEIVG
IKEDIQKAVV TGVEFRKQL DEGLAGDNV GLLRGVQRDE IERGQVLAKP
GSINPHTRFK GEVYILSKEE GGRHTPFNN YRPQFYFRIT DVTGSIELPA
GTEMVMPGDN VTIEVELIHP IAVEQGTTF S IREGGRTVGS GIVSEIEA

Fig. 1

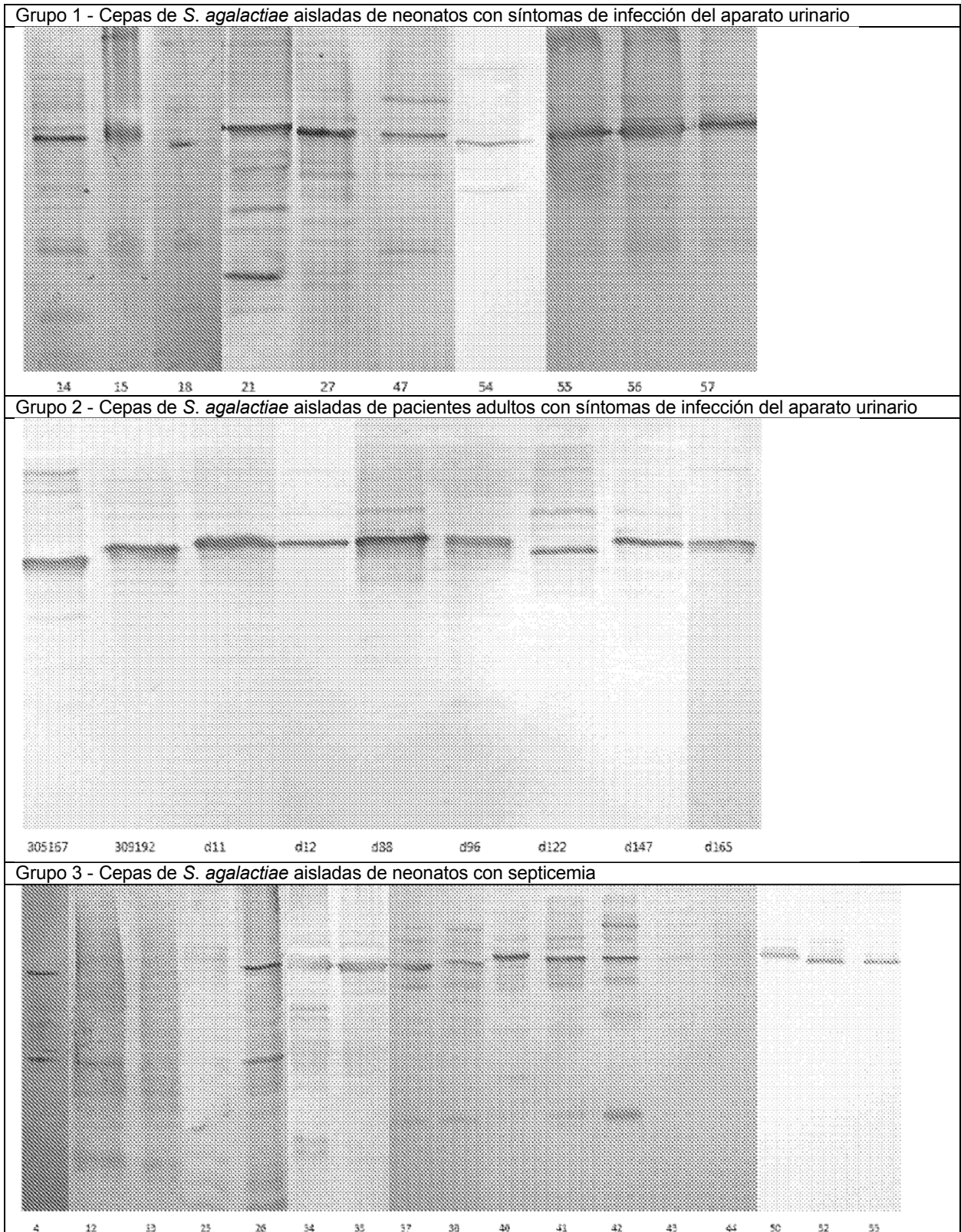


Fig. 2