



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 101**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98946991 .1**

86 Fecha de presentación : **14.09.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **1003875**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2000**

54 Título: **Vacunas de estreptococos del grupo A.**

30 Prioridad: **12.09.1997 US 58635 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2007

73 Titular/es:
**University of Tennessee Research Foundation
1534 White Avenue, Suite 403
Knoxville, Tennessee 37996-1527, US**

72 Inventor/es: **Dale, James, B.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 280 101 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).

ES 2 280 101 T3

DESCRIPCIÓN

Vacunas de estreptococos del grupo A.

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense N°= 60/058.635, presentada el 12 de Septiembre de 1997, solicitud que está incorporada mediante referencia en su totalidad.

10 Campo técnico

El presente invento proporciona las composiciones farmacéuticas y métodos, y en particular, vacunas para su uso en la prevención de infecciones por estreptococos del Grupo A.

15 Antecedentes del invento

Los estreptococos son un grupo de bacterias con la capacidad para crecer en cadenas. Muchas variedades son en parte de la flora bacteriana normal en humanos y no son especialmente dañinas. Sin embargo, un grupo particular de bacterias de estreptococos, llamadas grupo A y representadas por el *Streptococcus pyogenes*, es un patógeno humano. Brevemente, los estreptococos del grupo A causan una variedad de enfermedades humanas, que oscilan desde la faringitis y pioderma sin complicaciones hasta infecciones mortales asociadas con el síndrome del shock tóxico, invasión de tejidos profundos y sepsis. En algunos individuos, la faringitis por estreptococos sin tratar puede ser seguida de una fiebre reumática aguda. En años recientes ha habido un aumento dramático en la incidencia de infecciones graves por estreptococos (Davies y otros, "Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. Ontario group A Streptococcal study group," *N. Engl. J. Med.* 335:547-554, 1996) y en la incidencia de fiebre reumática (Veasey y otros, "Resurgence of acute rheumatic fever in the intermountain region of the United States". *N. Eng. J Med.* 316:421-427, 1987).

Aunque las infecciones por estreptococos pueden ser tratadas generalmente con antibióticos, en al menos un 4% de los casos la infección lleva a una fiebre reumática aguda. Esta enfermedad es particularmente prevalente en países en vías de desarrollo tales como India, en la que millones de niños en edad escolar están afectados.

El presente invento proporciona nuevas vacunas para estreptococos del Grupo A con una inmunogenicidad potenciada, y además proporciona otras ventajas relacionadas.

35 Sumario del invento

Expuesto brevemente, el presente invento proporciona polipéptidos de fusión inmunogénicos sintéticos que estimulan una respuesta inmune frente a los estreptococos del grupo A. Dentro de un aspecto tales polipéptidos comprenden (a) al menos dos polipéptidos inmunogénicos a partir del grupo A de al menos 10 aminoácidos de longitud que son capaces de estimular una respuesta inmune frente a los estreptococos del Grupo A, y un péptido C terminal al polipéptido inmunogénico que protege la inmunogenicidad de la porción inmunogénica. Dentro de las realizaciones preferidas, el péptido C terminal no se requiere para estimular una respuesta inmune frente a los estreptococos del Grupo A y por tanto, puede ser un péptido no inmunogénico sin consecuencias, o un polipéptido inmunogénico reiterado. Dentro de ciertas realizaciones, el polipéptido inmunogénico puede ser obtenido a partir de una gran variedad de estreptococos del Grupo A (que oscilan desde "1" hasta más de "90"), incluyendo por ejemplo los tipos 1, 1.1, 2,3,4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 22, 24, 28, 30, 48, 49, 52, 55 y 56.

Dentro de otros aspectos del presente invento, los agentes vacunantes son proporcionados para promover una respuesta inmune frente a los estreptococos del Grupo A, que comprenden (a) al menos dos polipéptidos inmunogénicos desde un estreptococo del Grupo A hasta al menos 10 aminoácidos en longitud que son capaces de estimular una respuesta inmune protectora en respuesta frente a estreptococos del Grupo A, y (b) un péptido C terminal al polipéptidos inmunogénico que protege la inmunogenicidad de la porción inmunogénica, en la que el péptido C terminal no es requerida para estimular una respuesta inmune frente a los estreptococos del grupo A. Como antes se menciona, el polipéptido puede ser seleccionado de una gran variedad de estreptococos del Grupo A (que oscilan desde "1" hasta más de "90"), incluyendo por ejemplo, tipos 1.1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 22, 24, 28, 30, 48, 49, 52, 55 y 56. Dentro de ciertas realizaciones adicionales, el agente vacunante puede comprender además un adyuvante, tal como, por ejemplo, alúmina, adyuvante de Freund, y/o un cofactor inmunomodulador (por ejemplo, IL-4, IL-10, INF- γ , o IL-2, IL-12 o IL-15).

También se proporcionan métodos para vacunar a un hospedante frente a infecciones de estreptococos de Grupo A, que comprenden administrar un agente vacunante como se describe anteriormente.

Estos y otros aspectos del presente invento serán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos. Además, diversas referencias son expuestas aquí que describen en más detalle ciertos procedimientos o composiciones (por ejemplo plásmidos, etc.), y son por lo tanto incorporadas mediante referencia en su totalidad.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema de la vacuna hexavalente que indica la longitud de cada fragmento del gen emm y los sitios de restricción que fueron sintetizados en los cebadores de PCR originales. Cada uno de los fragmentos génicos emm comienza en el primero codon que codifica la proteína nativa madura excepto el fragmento emm3, que representa los codones 21-70.

La Figura 2 es una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de la proteína hexavalente purificada teñida con azul de Coomassie. El análisis de imagen asistida por ordenador de las bandas proteicas teñidas indica que la proteína hexavalente (P.M. 45 KDa) cuenta el 90,3% de la proteína total en la muestra.

Las Figuras 3A y 3B son ELISAs de antisueros de tres ratones inmunizados con la vacuna hexavalente bien en alúmina o en CFA. Los valores de concentración son expresados como la inversa de la última dilución del suero que resultó en una D.O. de $> 0,1$. El antígeno de ELISA fue la proteína hexavalente purificada. Cada símbolo representa suero de un conejo.

Las Figuras 4A-4F son ELISAs de antisueros de conejos inmunizados con la proteína hexavalente en alúmina. Los valores de concentración fueron determinados usando las pepsina purificadas -extracto de proteínas M (pep M) a partir de los serotipos respectivos de estreptococos del grupo A. Cada símbolo representa uno de tres conejos inmunizados.

La Figura 5 describe ensayos de opsonización *in vitro* de antisueros de conejos inmunizados con la proteína hexavalente en alúmina. Las mezclas de rotación consistieron en el organismo de ensayo, 0,1 ml de suero inmune, y 0,4 ml de sangre humana no inmune. La mezcla fue hecha rotar durante 45 minutos y el porcentaje de PMNs que habían ingerido o estuvieron asociados con estreptococos fue estimado mediante cuentas microscópicas de frotis teñidos. En cada ensayo, el suero preinmune resultó en un porcentaje de $< 10\%$ de opsonización. Cada barra diferente representa sueros de uno de los tres conejos inmunizados.

La Figura 6 es un gráfico que describe la opsonización de diferentes cepas dentro del mismo serotipo de estreptococos del grupo A promovido por el antisuero de conejo hexavalente. Cada símbolo representa una cepa de estreptococos del grupo A del serotipo indicado en el eje horizontal. Los ensayos de opsonización fueron realizados como se describieron a continuación en los Ejemplos.

La Figura 7 es una secuencia de la vacuna de proteína M hexavalente (SEQ ID N°: 15 y SEQ ID N°: 16).

Descripción detallada del invento

Definiciones

Previamente a exponer el invento, puede ser de ayuda para entender el mismo exponer las definiciones de ciertos términos que serán usados a partir de aquí.

“Agente vacunante” se refiere a una composición que es capaz de estimular una respuesta inmune protectora dentro del hospedante que recibe el agente vacunante. El agente vacunante puede ser bien una proteína, o, un agente basado en el ADN (como por ejemplo un vehículo de suministro génico). Dentro de aspectos adicionales, se puede generar un hospedante procariótico que sea un agente vacunante, y diseñarlo para que exprese un polipéptido inmunogénico o una construcción multivalente del presente invento (véase por ejemplo, la solicitud norteamericana N° 07/540.586).

Un “vehículo de suministro génico” se refiere a un vehículo recombinante, tal como un vector viral recombinante, un vector de ácidos nucleicos (tal como un plásmido), una molécula de ácidos nucleicos desnuda tal como genes, una molécula de ácidos nucleicos acomplejada a una molécula policatiónica capaz de neutralizar la carga negativa de la molécula de ácidos nucleicos y condensar la molécula de ácidos nucleicos en una molécula compacta, un ácido nucleico asociado con un liposoma (Wang y otros, *PNAS* 84: 7851, 1987), una bacteria, y ciertas células eucarióticas tales como células productoras, que son capaces de suministrar una molécula de ácidos nucleicos que tienen uno o más propiedades deseables para las células hospedantes en un organismo.

Como se observa anteriormente, el presente invento proporciona agentes vacunantes adecuados para prevenir las infecciones por estreptococos del Grupo A. Brevemente, como se describe a continuación con más detalle, ha sido descubierto que, para optimizar la inmunogenicidad de todos los aspectos de una vacuna multivalente, dentro de un aspecto del invento, se proporcionan los polipéptidos de fusión sintéticos inmunogénicos que estimulan una respuesta inmune frente a los estreptococos del grupo A. Tales polipéptidos comprenden generalmente (a) al menos dos polipéptidos inmunogénicos de los estreptococos del grupo A de al menos 10 aminoácidos de longitud que son capaces de estimular una respuesta inmune frente a los estreptococos del grupo A, y (b) un péptido C terminal al polipéptidos que protege la inmunogenicidad de la porción inmunogénica, en la que el péptido C terminal no es requerido para estimular una respuesta inmune frente a los estreptococos del grupo A. Péptidos protectores particularmente preferidos son generalmente de diez aminoácidos de longitud, y pueden ser de 30 aminoácidos o más largos.

ES 2 280 101 T3

Identificación de polipéptidos inmunogénicos, para usar como agentes vacunantes

Polipéptidos inmunogénicos adecuados para usar dentro del presente invento puede ser fácilmente identificados y generados dada la descripción de la presente solicitud (véase también Dale y Beachey, *J. Exp. Med.* 163: 1191-1202; 1986; Beachey y otros, *Nature* 292: 457-459, 1981; Dale y otros *J. Immunol* 151:2188-2194; 1993; y patentes norteamericanas N^os: 4.454.121; 4.521.334; 4.597.967; 4.705.684; 4.919.930; y 5.124.153). Polipéptidos particularmente preferidos pueden ser obtenidos dentro de los 50 residuos aminoacídicos del extremo N-terminal de una proteína M.

Los serotipos de estreptococos del grupo A pueden ser fácilmente obtenidos a partir de aislados clínicos, de colecciones universitarias (por ejemplo, Colección de la universidad Rockefeller, 1230 York Avenue, Nueva York, NY) o de depósitos tales como la colección americana de cultivos tipo (10801 University Boulevard, Manassas, Virginia). Además, las secuencias para los serotipos de estreptococos del grupo A están disponibles a partir de los centros para el control de enfermedades, Atlanta, Georgia.

A. Identificación de epítomos opsonizantes de proteínas M

Para demostrar directamente que los epítomos de proteínas M opsonizantes podrían separarse de los epítomos autoinmunes, los péptidos son copiados a partir de diversos serotipos (por ejemplo, los 20-50 aminoácidos amino terminal de M5 (Beachey y otros, "Purification and properties of M protein extracted from group A streptococci with pepsin: Covalent structure of the amino terminal region of the type 24 M antigen", *J. Exp. Med.* 145: 1469-1483, 1977). SM5 (1-20) no pudo reaccionar con los anticuerpos reactivos frente a pep M5 de corazón purificados mediante afinidad (Beachey y otros, "Purification and properties of M proteins extracted from group A streptococci with pepsin: Covalent structure of the amino terminal region of the type 24 M antigen". *J. Exp. Med.* 145: 1469-1483, 1977). Conejos inmunizados con SM5 (1-20) acoplados al toxoide tetánico desarrollaron anticuerpos a elevada concentración frente a pep M5 que opsonizó los estreptococos de tipo 5 (Beachey y otros, "Purification and properties of M protein extracted from group A streptococci with pepsin: Covalent structure of the aminoterminal region of the type 24 M antigen", *J. Exp. Med.* 145: 1469-1483, 1977). De modo más importante, ninguno de los sueros inmunes reaccionó de modo entrecruzado con el miocardio humano.

B. Epítomos de reacción entrecruzada de tejido para las proteínas M

Las proteínas M evocan anticuerpos que reaccionan de modo entrecruzado con una variedad de tejidos humanos y antígenos dentro de esos tejidos (Baird y otros, "Epitopes of group A streptococcal M protein shared with antigens of articular cartilage and synovium", *J. Immunol.* 146: 3132-3137, 1991; Bronze, M. S. y Dale, J. B., "Epitopes of streptococcal M proteins that evoke antibodies that cross-react with human brain", *J. Immunol.* 151:2820-2828., 1993; Dale, J.B. and Beachey E.H., "Protective antigenic determinant of streptococcal M protein shared with sarcolemmal membrana protein of human Heart", *J. Exp. Med.* 156: 1165-1176, 1982). Para determinar la reactividad cruzada, una serie de péptidos solapantes es sintetizada que copia fragmentos seleccionados (por ejemplo M5), y es usada para bien inhibir o evocar anticuerpos de reactividad entrecruzada de tejidos. Por ejemplo, los anticuerpos de reacción entrecruzada para miosina evocados por pep M5 en conejos fueron casi totalmente inhibidos por el péptido 84-116 de pep M5. Este péptido se extiende por la región entre las repeticiones A y B de M5 e incluye la repetición A6 degenerada. Anticuerpos murinos y humanos de reactividad entrecruzada para la miosina reaccionaron con un epítomo del péptido 183-189, que está localizado en la región entre las repeticiones B y C de la molécula M5 intacta.

Los epítomos de reactividad entrecruzada para la membrana del sarcolema adicionales están localizados en el péptido 164-197. Varios epítomos de M5 que evocan anticuerpos que reacciona de modo entrecruzado con el cartílago articular y sinovio pueden también encontrarse dentro de las repeticiones B y la región que se extiende en las repeticiones A y B de M5. Los epítomos de reactividad entrecruzada del cerebro de M6 que fueron compartidos con otras proteínas M están localizados en la región de repetición B de la molécula.

Muchos de los epítomos de reactividad entrecruzada con tejidos son compartidos entre las proteínas M de tipo 5, 6, 18 y 19 (Bronze, M. S. y Dale, J. B., "Epitopes of streptococcal M proteins that evoke antibodies that cross-react with human brain", *J. Immunol.* 151:2820-2828. 1993). Los datos de estructura primaria revelan que todas estas proteínas M contienen secuencias similares dentro de sus repeticiones B (Dale y otros, "Recombinant tetravalent group A streptococcal M protein vaccine", *J. Immunol.* 151:2188-2194, 1993; Dale y otros., "Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine", *Vaccine* 14:944-948, 1996; Dale y otros, "Type-specific immunogenicity of a chemically synthesized peptide fragment of type 5 streptococcal M protein", *J. Exp. Med.* 158: 1727-1732, 1983), que es con mucha probabilidad la localización de los epítomos de reacción entrecruzada combinados de corazón, cerebro y articulación.

Debería enfatizarse que no es necesario localizar el epítomo específico de tejido, sino más bien, localizar primero los epítomos protectores y asegurar que no hay tejidos reactivos.

Una vez que un polipéptidos inmunogénico adecuado para un serotipo seleccionado ha sido identificado, puede ser, opcionalmente combinado con polipéptidos inmunogénicos a partir de otros serotipos, para construir una vacuna multivalente. A este respecto las vacunas preferidas incluyen vacunas desarrolladas a partir de una combinación de serotipos tales como 1,1.1, 2, , 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 18, 19, 22, 24, 30, 48, 49, 52, 56 (para serotipo 30 véase Nakashima y otros, *Clin Infec. Dis.* 25: 260, 1997). Ejemplos representativos incluyen vacunas tales como 24, 5, 6, 19, 1, 3, X; y 1, 3, 5, 6, 18, 19, 22, 24, 28, 30, y X, en el que X es el polipéptido protector C terminal.

Preparación de agentes vacunantes

Los agentes vacunantes del presente invento pueden ser sintetizados químicamente (véase por ejemplo, Beachey otros, *Nature* 292: 457-459, 1981), o generados de modo recombinante. Para la producción recombinante, los cebadores de PCR pueden ser sintetizados para amplificar las secuencias 5' deseadas de cada gen emm, y cada cebador se extiende para contener un sitio de enzima de restricción único usado para ligar los productos de PCR individuales en tándem.

Como se observa anteriormente, la porción C terminal del agente vacunante es construida a modo de contener una porción selectiva que puede perderse o cortarse *in vivo* sin afectar la eficacia de la vacuna. Esto puede lograrse mediante, por ejemplo, la inclusión de un polipéptido no inmunogénico sin consecuencias en el extremo, o, incluyendo un polipéptido inmunogénico que no impacta de modo adverso en la eficacia de la vacuna (por ejemplo, un polipéptido inmunogénico reiterado puede estar incluido en el extremo de la vacuna). Además, los antígenos protectores a partir de patógenos sin relacionar pueden también combinarse en un polipéptido único, que pueden compensar la necesidad de vehículos. Las vacunas frente a algunos patógenos pueden incluir epítomos de células T y B originalmente derivados de diferentes proteínas en la misma construcción híbrida. Adicionalmente, las proteínas híbridas multivalentes pueden ser conjugadas lo suficiente en vacunas de carbohidratos, tales como aquellas para *S. pneumoniae*, *H. influenza B* o los estreptococos del grupo B.

Para la expresión de proteínas, los genes multivalentes están ligados en cualquier plásmido de replicación que se usa para transformar una cepa hospedadora procarionta apropiada. Los procariontes incluyen organismos gram negativo o gram positivo, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Células hospedantes procariontes adecuadas para transformación incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y diversas otras especies dentro del género *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*.

Los vectores de expresión transfectados en células hospedantes procariontes comprenden generalmente uno o más marcadores de selección fenotípicos tales como, por ejemplo, un gen que codifica proteínas que confieren resistencia a antibióticos o que suministran un requerimiento autotrófico, y un origen de replicación reconocido por el hospedante que asegura la amplificación dentro del hospedante. Otros vectores de expresión para células hospedantes procariontes incluyen un marcador de selección de origen bacteriano derivado de plásmidos disponibles comercialmente. Este marcador de selección puede comprender elementos genéticos del vector pBR322 de clonaje (ATCC 37017). Brevemente, pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y así proporciona medios simples para identificar células transformadas. Las secciones del "esqueleto" de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y una secuencia génica estructural ETF de mamífero. Otros vectores comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), pQE30 y pGEM 1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA).

Las secuencias de promotores comunes para su uso dentro de vectores de expresión procariontes incluyen la β -lactamasa (penicilinas), sistema promotor de lactosa (Chang y otros, *Nature* 275: 615, 1978; y Goeddel y otros, *Nature* 281: 544, 1979), y el sistema promotor triptófano (*trp*) (Goeddel y otros, *Nucl. Acids Res.* 8: 4057, 1980; y el documento de patente EPA 36.776) y promotor *tac* (Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989)). Un sistema de expresión de células hospedantes procariontes particularmente útil emplea un promotor P_L de fago λ y una secuencia represora termolábil *cl857ts*. Los vectores plasmídicos disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo que incorpora derivados del promotor P_L de fago λ incluye el plásmido pHUB2 (residente en la cepa *E. coli* JMB9 (ATCC 37092)) y pPLc28 (residente en *E. coli* RR1 (ATCC 53082)).

La transformación de las cepas hospedantes de *E. coli* es lograda mediante electroporación usando métodos estándar (Dale y otros, "Recombinant tetravalent group A streptococcal M protein vaccine", *J. Immunol.* 151: 2188-2194, 1993; Dale y otros, "Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine," *Vaccine* 14: 944-948, 1996). Transformantes con éxito son identificados mediante transferencia de colonias usando sueros de conejo generados frente a una de las proteínas M nativas o una copia peptídica sintética de amino terminal de una de las proteínas M incluidas en la proteína multivalente.

El tamaño molecular y la antigenicidad de la proteína recombinante expresada mediante clones seleccionados son determinados realizando transferencias Western de extractos de *E. coli* (Dale y otros, "Recombinant tetravalent group A streptococcal M protein vaccine", *J. Immunol.* 151: 2188-2194, 1993) usando antisueros de conejo generados frente a cada proteína M nativa purificada a partir de extractos de pepsina de estreptococos vivos (Beachey y otros, "Purification and properties of M protein extracted from group A streptococci with peptin: Covalent structure of the amino terminal region of the type 24 M antigen," *J. Exp. Med.* 145: 1469-1483, 1977). El gen multivalente es secuenciado mediante el método de terminación de cadena por nucleótido didesoxi para confirmar que cada fragmento génico es una copia exacta de la secuencia emm nativa.

Vacunas basadas en vehículos de suministro génico

Se ha demostrado que la inyección de mamíferos con vehículos de suministro génico (por ejemplo, ADN desnudo) que codifican antígenos de diversos patógenos tiene como resultado respuestas inmunes protectoras (Ulmer y otros, *Science* 259: 1745-9, 1993; Bourne y otros, *J. Infect. Dis.* 173: 800-7, 1996; Hiffman y otros, *Vaccine* 12: 1529-33, 1994). Puesto que la descripción original de la expresión *in vivo* de proteínas extrañas a partir de ADN desnudo inyectado en tejido muscular (Wolf y otros, *Science* 247: 1465-8, 1990), ha habido varios avances en el diseño y suministro de ADN para propósitos de vacunación.

Las vacunas de proteína M descritas anteriormente se ajustan de modo ideal para el suministro vía ADN desnudo ya que la inmunidad protectora está en última instancia determinada por anticuerpos. Por ejemplo, dentro de una de las realizaciones los genes multivalentes están ligados en plásmidos que se modifican mediante ingeniería específicamente para la expresión en células de mamífero (véase, por ejemplo, Hartikka y otros, *Hum Gene Ther* 7: 1205-17, 1996, que contiene el elemento promotor/potenciador del gen temprano de citomegalovirus, el péptido señal del activador de plasminógeno tisular humano y un elemento terminador a partir del gen de la hormona de crecimiento bovino). Los genes híbridos de proteína M pueden ser clonados en el plásmido que es usado para transfectar líneas celulares humanas para asegurar la expresión de proteína recombinante. El plásmido es propagado en *E. coli* y purificado en cantidades suficientes para estudios de inmunización mediante centrifugación en gradiente de cloruro de cesio. Los ratones son inmunizados con 50 μg de plásmido en 50 μl de salino dado intramuscularmente en el rectus femoris. Inyecciones de refuerzo de la misma dosis son dadas a tres y seis semanas tras la inyección inicial.

Una amplia variedad de otros vehículos de suministro génico puede igualmente ser utilizada dentro del contexto del presente invento, incluyendo por ejemplo, virus, retrotransposones y cósmidos. Ejemplos representativos incluyen vectores adenovirales (por ejemplo, documentos de patentes WO 94/26914, WO 93/9191; Yei y otros, *Gene Therapy* 1:192-200, 1994; Kolls y otros, *PNAS* 91 (1): 215-219, 1994; Kass-Eisler y otros, *PNAS* 90 (24): 11498-502, 1993; Guzman y otros *Circulation* 88(6): 2838-48, 1993; Guzman y otros *Cir. Res.* 73 (6): 1202-1207, 1993; Zabner y otros *Cell* 75(2): 207-216, 1993; Li y otros, *Hum Gene Ther.* 4(4): 403-409, 1993; Caillaud y otros, *Eur. J. Neurosci.* 5 (10): 1287-1291, 1993), vectores adeno-asociados tipo 1 ("AAV-1") o adeno-asociados tipo 2 ("AAV-2") (véase el documento de patente WO 95/13365; Flotte y otros, *PNAS* 90(22): 10613-10617, 1993), vectores de hepatitis delta, virus delta vivos y atenuados y vectores virales de herpes (por ejemplo, documento de patente norteamericana N° 5.288.641), así como vectores que están descritos dentro de la patente norteamericana N° 5.166.320. otros vectores representativos incluyen vectores retrovirales (por ejemplo, documento de patente EP 0 415 731; documentos de patente WO 90/07936; WO 91/02805; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; documento de patente norteamericana N° 5.219.740; WO 93/11230; WO 93/10218). Los métodos para usar tales vectores en terapia génica son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Larrick, J. W. y Burck, K.L., *Gene Therapy: Application of Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing Co., Inc., Nueva York, Nueva York, 1991; y Dreigler, M., *Gene Transfer and expression: A Laboratory Manual*, W.H. Freeman and Company, Nueva York, 1990.

Vehículos de suministro génico pueden ser introducidos en una célula hospedante utilizando un vehículo, o mediante diversos métodos físicos. Los ejemplos representativos de tales métodos incluyen la transformación usando precipitación por fosfato cálcico (Dubensky y otros, *PNAS* 81: 7529-7533, 1984), microinyección directa de tales moléculas de ácidos nucleicos en células diana intactas (Acsadi y otros, *Nature* 352:815-818, 1991), y electroporación mediante la cual las células suspendidas en una disolución conductora son sometidas a un campo eléctrico intenso para polarizar de modo transitorio la membrana, permitiendo entrar a las moléculas de ácidos nucleicos. Otros procedimientos incluyen el uso de moléculas de ácidos nucleicos unidas a un adenovirus inactivo (Cotton y otros, *PNAS* 89:6094, 1990), lipofección (Felgner y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417, 1989), bombardeo de microproyectiles (Williams y otros, *PNAS* 88:2726-2730, 1991), compuestos policationicos tales como polilisina, ligandos específicos de receptor, liposomas que atrapan las moléculas de ácidos nucleicos, esferoplastos de fusión a través de los cuales *E. coli* que contienen las moléculas de ácidos nucleicos son desprovistas de la pared celular externa y unidas a células animales usando polietilenglicol, transducción viral, (Cline y otros., *Pharmac. Ther.* 29:69, 1985; y Friedmann y otros, *Science* 244:1275, 1989), y ligando ADN (Wu y otros, *J. of Biol. Chem.* 264:16985-16987, 1989), así como virus psoraleno inactivos tales como Sendai o Adenovirus.

Suero a partir de ratones inmunizados con vehículos de suministro génicos que contiene genes de proteínas M multivalentes son ensayados en lo que se refiere a la concentración de anticuerpo total mediante ELISA usando proteínas M nativas como antígeno. Anticuerpos opsonizantes séricos son ensayados como se describe anteriormente. La eficacia protectora de vacunas de ADN de proteínas M es determinada mediante ensayos directos de protección de ratón usando los serotipos de estreptococos de grupo A representados en la vacuna.

Formulación y administración

Para el uso terapéutico, los agentes de vacunación pueden ser administrados a un paciente por una variedad de rutas, incluidos por ejemplo, por rutas intramusculares, subcutáneas y mucosas. Los agentes de vacunación pueden ser administrados como una dosis única o en múltiples unidades a lo largo de un período prolongado de tiempo. Dentro de las realizaciones preferidas, el agente de vacunación es administrado a un humano en una concentración de 50-300 μg por inyección intramuscular de sitio único. Varias inyecciones pueden ser administradas (por ejemplo, tres o cuatro) al menos una vez al mes a parte para incrementar además la eficacia de la vacuna.

Típicamente, el agente de vacunación será administrado en forma de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido purificado en conjunción con vehículos, excipientes o diluyentes aceptables fisiológicamente. Dichos excipientes serán no tóxicos para los pacientes en las dosis y concentraciones empleadas. De modo ordinario, la preparación de dichos compuestos supone la combinación del agente de vacunación con tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos que incluyen glucosa, sacarosa o dextrano, agentes quelantes como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. El salino tamponado neutro o salino mezclado con albúmina de suero no específico son diluyentes apropiados ejemplares.

ES 2 280 101 T3

Dentro de las realizaciones preferidas del invento, el agente de vacunación es combinado con un adyuvante, tal como, por ejemplo, el adyuvante de Freund, alúmina y los semejantes.

Los siguientes ejemplos son ofrecidos a modo de ilustración y no a modo de limitación.

5

Ejemplos

Ejemplo 1

10 *Construcción y expresión de un gen de fusión hexavalente*

Un gen emm hexavalente fue construido usando PCR para amplificar las regiones 5' específicas de los seis genes emm diferentes (24, 5, 6, 19, 1 y 3) esencialmente como se describe previamente (Dale y otros, "Recombinant tetravalent group A streptococcal M protein vaccine", *J. Immunol.* 151:2188-2194, 1993; Dale y otros, "Recombinant octavalent group A streptococcal M protein vaccine", *Vaccine* 14:944-948, 1996).

15

Brevemente, los genes multivalentes son construidos usando PCR y los cebadores que especifican los fragmentos de gen emm 5' específicos. Los fragmentos de gen pueden tener un tamaño de intervalo de entre 30 bp a 300 bp. El ADN cromosómico de cada serotipo de estreptococos del grupo A es usado como molde para las reacciones PCR. Para el gen emm hexavalente descrito en el ejemplo, los cebadores de PCR son como sigue:

20

M24-1 TS SphI

5' GGG GGG GCA TCG GTC GCG ACT AGG TCT CAG ACA GAT 3'

25

(SEQ ID NO:1)

M24-1 BS BamHI

5' GGG GGG GGA TCC ACG TAG TTT CTC TTT AGC 3'

30

(SEQ ID NO:2)

M5 TS BamHI

5' GGG GGG GGA TCC GCC GTG ACT AGG GGT ACA 3'

35

(SEQ ID NO:3)

M5 BS SalI

5' GGG GGG GTC GAC CTC AGT TTT TAA CCC TTC 3'

45

(SEQ ID NO:4)

M6 TS SalI

5' GGG GGG CCA TGG TAA CTT GTC ATT ATT AGC 3'

50

(SEQ ID NO:5)

M6 BS NcoI

5' GGG GGG CCA TGG TAA CTT GTC ATT ATT AGC 3'

55

(SEQ ID NO:6)

M19 TS NcoI

5' GGG GGG CCA TGG AGA GTG CGT TAT ACT AGG 3'

65

(SEQ ID NO:7)

ES 2 280 101 T3

M19 BS PstI

5' GGG GGG CTG CAG AGA TAA CTT CTC ATT CTG 3'

(SEQ ID NO:8)

M1 TS PstI

5' GGG GGG GGT ACC AGC TCT CTT AAA ATC TCT 3'

(SEQ ID NO:9)

M1 BS KpnI

5' GGG GGG GGT ACC AGC TCT CTT AAA ATC TCT 3'

(SEQ ID NO:10)

M3 TS KpnI

5' GGG GGG GGT ACC TTG TTA GAT CAG GTT ACA 3'

(SEQ ID NO:11)

M3 BS ClaI

5' GGG GGG ATC GAT ATT TAA CTC TTG TAA CAG 3'

(SEQ ID NO:12)

M24-2 TS ClaI

5' GGG GGG ATC GAT GTC GCG ACT AGG TCT CAG 3'

(SEQ ID NO:13)

M24-2 BS HindIII

5' GGG GGG AAG CTT TTA CTT ACG TGC CTC TAA TTC 3'

(SEQ ID NO:14)

55 La PCR es realizada en el molde cromosómico como se describe previamente (Dale y otros, "Recombinant tetra-
valent group A streptococcal M protein vaccine", *J. Immunol.* 151:2188-2194, 1993). Para asegurar la ligación de los
fragmentos en la orientación y marco de lectura correctos, cada producto de PCR es purificado, unido y luego some-
tido de nuevo a PCR usando el cebador directo del fragmento 5' y el cebador inverso del fragmento 3'. Por ejemplo,
60 para construir un gen emm hexavalente que contiene secuencias de ADN de los tipos 24, 5, 6, 19, 1 y proteínas 3 M,
los fragmentos de los genes M24 y M5 son amplificados mediante PCR usando los cebadores descritos anteriormente.
Los productos de PCR son purificados de los geles de agarosa, cortados con la enzima de restricción apropiada, y liga-
dos juntos (Dale y otros, "Recombinant tetra-
valent group A streptococcal M protein vaccine", *J. Immunol.* 151:2188-
2194, 1993; Dale y otros, "Recombinant, octavalent group A streptococcal M protein vaccine", *Vaccine* 14:944-948,
1996). La mezcla de ligación es luego amplificada mediante PCR usando el cebador M24 delantero y el cebador M5
65 inverso. El producto resultante del tamaño apropiado es luego purificado y unido al fragmento del gen M6 y M19 que
fue construido similarmente. Después de la reacción de ligación final, el gen entero es amplificado de nuevo mediante
PCR, cortado con las enzimas de restricción apropiadas y unido en un vector de expresión adecuado. Para la adición

ES 2 280 101 T3

del reiterado fragmento del gen M24 en el sitio 3', el plásmido fue purificado del hospedante *E. coli* y un nuevo producto PCR del emm 24 fue clonado a la fuerza en el sitio de restricción 3' PstI.

El gen hexavalente fue secuenciado mediante el método de terminación de la cadena por didesoxi-nucleótido para confirmar que cada fragmento del gen fue una copia exacta de la respectiva secuencia emm nativa.

Ejemplo 2

Purificación de una vacuna hexavalente

A. Purificación

Los *E. coli* transformados se hicieron crecer en un incubador con agitación hasta fase log en 1 l. de LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina. El IPTG (2 mM) fue añadido al final de las cuatro horas de crecimiento. La célula de precipitación fue suspendida en 30 ml de PBS y lisada en una célula de presión francesa a 1000 psi. La proteína hexavalente fue purificada del sobrenadante usando la resina Ni-NTA según el protocolo proporcionado por el fabricante (Qiagen). El tampón de elución que contenía la proteína fue concentrado de 15 ml a 5 ml en un filtro de centrifuga (Ultrafree-15, Millipore). La purificación final fue llevada a cabo por la filtración del gel sobre Superdex 75 (de calidad prep, Pharmacia Biotech). La fracción activa fue identificada por transferencia Western (Dale, J.B. y Beachey, E.H., "Multiple Heart-cross-reactive epitopes of streptococcal M proteins", *J. Exp. Med.* 161:113-122, 1985) usando el antisuero de conejo contra el pep M24 (Beachey y otros, "Purification and properties of M protein extracted from group A streptococci with pepsin: Covalent structure of the amino Terminal region of the type 24 M antigen", *J. Exp. Med.* 145:1469-1483, 1977). La concentración de la proteína total fue determinada por métodos estándar y la muestra fue diluida en PBS para contener 200 µg/ml de la proteína hexavalente. La pureza de las muestras fue determinada mediante escaneado del gel (Photoshop digital image and Collage image analysis).

B. Análisis de la vacuna hexavalente

La estructura del gen emm híbrido fue confirmada por los métodos de secuenciación de la doble hebra después de la ligación en el pQE30. La secuencia de cada subunidad fue idéntica a la del respectivo gen emm nativo (Figura 1). Los fragmentos fueron unidos sólo por los dos aminoácidos especificados por cada sitio de restricción único usado para facilitar su unión (Figura 1).

La proteína hexavalente purificada migró en los geles de poliacrilamida-SDS con un P.M. aparente de 45 kDa. (Figura 2). Los análisis de escaneado de gel revelaron que la proteína hexavalente intacta daba cuenta del 90% aproximadamente del total de la proteína susceptible a tinción en el gel. Las transferencias Western que usan los antisueros frente al pep M24 mostraron que la mayoría de las bandas de proteínas restantes fueron inmunoreactivas y las más parecidas fueron los fragmentos de la proteína hexavalente (datos no mostrados).

Ejemplo 3

Inmunización de conejos, y ensayo de antisueros

A. Inmunización

Dos grupos, de tres conejos cada uno, fueron inmunizados con 100 µg de la vacuna hexavalente, o bien precipitados con alúmina o emulsionados en un adyuvante completo de Freund. Para la precipitación en alúmina, la proteína hexavalente (200 µg/ml) fue añadida en un volumen igual de hidróxido de aluminio (2 mg/ml) (Rehydragel HPA, Reheis, Inc., Berkeley Heights, NJ) y mezclado con cuidado a 40°C durante toda la noche. La proteína hexavalente fue también emulsionada en CFA a una concentración final de 100 µg/ml. A los conejos que recibieron la vacuna hexavalente en alúmina se les dio 100 µg I.M. como inyección inicial y la misma dosis fue repetida en 4 y 8 semanas. El segundo grupo de conejos recibió 100 µg de la vacuna hexavalente en CFA subcutáneamente como inyección inicial y luego se les dieron inyecciones de refuerzo de la misma dosis en salino en 4 y 8 semanas. La sangre fue obtenida antes de la primera inyección y en intervalos de 2 semanas a partir de entonces.

Ensayos de anticuerpos. Los ELISAs fueron realizados usando las proteínas M extraídas de la pepsina nativa purificada (Beachey y otros, "Purification and properties of M protein extracted from group A streptococci with pepsin: Covalent structure of the amino Terminal region of the type 24 M antigen", *J. Exp. Med.* 145:1469-1483, 1977) o de la proteína hexavalente purificada, como se describe anteriormente (Dale y otros, "Heterogeneity of type-specific and cross-reactive antigenic determinants within a single M protein of group A streptococci", *J. Exp. Med.* 151:1026-1038, 1980). Los anticuerpos opsonizantes fueron detectados por ensayos de opsonización *in Vitro* y ensayos bactericidas indirectos (Beachey y otros, "Human immune response to immunization with a structurally defined polypeptide fragment of streptococcal M protein", *J. Exp. Med.* 150:862-877, 1979).

B. Detección de los anticuerpos de la proteína M

Los sueros de animales preinmunes e inmunes fueron ensayados mediante ELISA usando la proteína vacuna y las proteínas M extraídas- pepsina nativa como antígenos de fase sólida (Dale y otros, "Heterogeneity of type-specific and

ES 2 280 101 T3

cross-reactive antigenic determinants within a single M protein of group A streptococci”, *J. Exp. Med.* 151:1026-1038, 1980). Las concentraciones para ELISA son definidas como el inverso de la última dilución de antisuero resultante en una D.O. de > 0,1 a 450 nm. Las concentraciones de suero inmune frente al antígeno M nativo son más probables a la hora de predecir los niveles de anticuerpos que son evocados por la proteína recombinante que reaccionarán con la proteína M en la superficie del serotipo respectivo del estreptococo (es decir, que promueve la opsonización).

C. Detección de los anticuerpos opsonizantes

Los anticuerpos de la proteína M opsonizante se correlacionan con la protección contra la infección con el mismo serotipo del estreptococo A (Lancefield, R.C., “Current knowledge of the type specific M antigens of group A streptococci”, *J. Immunol.* 89:307-313, 1962; Lancefield, R.C., “Persistence of type-specific antibodies in man following infection with group A streptococci”, *J. Exp. Med.* 110:271-282, 1959). Dos ensayos *in vitro* relacionados son usados para detectar los anticuerpos opsonizantes en el suero inmune. El primero es un ensayo de muestreo que mide la opsonización en mezclas de suero inmune, sangre humana no inmune completa y el organismo de ensayo (Beachey y otros, “Purification and properties of M protein extracted from group A streptococci with pepsin: Covalent structure of the amino terminal region of the type 24 M antigen”, *J. Exp. Med.* 145:1469-1483, 1977). 0,1 ml de suero de ensayo son añadidos a un número estándar de bacterias e incubados durante 15 minutos a temperatura ambiente. 0,4 ml de sangre humana heparinizada ligeramente son añadidos y la mezcla entera es hecha girar extremo sobre extremo a 370 durante 45 minutos. Al final de la rotación, los frotis son preparados en el portaobjetos del microscopio que son secados al aire y teñidos con tinción de Wright. “El porcentaje de opsonización” es cuantificado al contar el porcentaje de los leucocitos polimorfonucleares que son ingeridos o están asociados a las bacterias. Un ensayo interpretable debe tener un valor de control preinmune que es del 10% de opsonización o menor.

La confirmación de la presencia de anticuerpos opsonizantes es obtenida por ensayos de anticuerpo bactericidas indirectos según la descripción original por Lancefield (Lancefield, R.C., “Current knowledge of the type specific M antigens of group A streptococci”, *J. Immunol.* 89:307-313, 1962). Este ensayo es realizado usando mezclas de ensayo como se describe anteriormente excepto que son añadidas menos bacterias y la rotación se deja seguir durante 3 horas. Al final de la rotación, las placas de vertido se hacen en agar de sangre de oveja y las bacterias que sobreviven son cuantificadas después del crecimiento durante toda la noche a 370. El porcentaje de muertes en presencia del suero inmune es calculado por comparación con el crecimiento en el suero no inmune.

Ejemplo 4

Ensayos de protección de ratón

A. Protocolo general

La eficacia protectora de las vacunas de proteína M es determinada bien mediante ensayos indirectos o bien directos de protección de ratón (inmunización pasiva o activa). Los ensayos indirectos son realizados dándole al ratón 1 ml de suero inmune o preinmune por ruta intraperitoneal (i.p) 24 horas antes de probar infecciones con el organismo de ensayo vía i.p. (Beachey y otros, “Human immune response to immunization with a structurally defined polypeptide fragment of streptococcal M protein”, *J. Exp. Med.* 150:862-877, 1979). Para cada organismo de ensayo, los grupos de 25 ratones recibieron bien suero preinmune o bien inmune. Los animales son luego divididos en 5 grupos de 5 ratones cada uno y se les dan a cada subgrupo las dosis prueba incrementadas 10 veces de estreptococo virulento. Después de 7 días de observación, el LD₅₀ es calculado para cada serotipo ensayado.

Los ensayos de protección de ratón directo son realizados similarmente excepto en que los ratones son inmunizados activamente con la vacuna de la proteína M antes de las infecciones de prueba. Cada ratón recibe 25-50 μg de vacuna en alúmina dada de formar intramuscular (i.m.) en un tiempo de 0,4 semanas y 8 semanas. Las infecciones desafiantes son realizadas diez semanas después de la primera inyección. Los animales testigo son falsamente inmunizados con alúmina solo. El LD₅₀ es calculado y su significado es determinado usando el ensayo exacto de Fisher.

B. Protección

Para mostrar directamente la eficacia protectora de los anticuerpos opsonizantes evocada por la vacuna hexavalente, los ratones fueron inmunizados con la vacuna adsorbida de ALÚMINA y luego ensayado con dos de los serotipos representados en la vacuna. Las hembras cruzadas con ratones suizos fueron inmunizadas por la ruta I.M. en la pata trasera según el siguiente programa: tiempo 0, 25 μg ; 3 semanas, 25 μg ; 6 semanas, 50 μg ; y 13 semanas, 50 μg . Los experimentos prueba fueron realizados en los 20 ratones inmunizados y en 20 testigos, ratones no inmunizados (Tabla 1). Las cepas de prueba fueron tipos 24 y 19, con el razonamiento de que el péptido M24 es el fragmento más largo en la proteína hexavalente y es reiterada y el fragmento M 19 es uno de los dos que son sólo 35 aminoácidos de longitud. Estos dos fragmentos deberían reflejar el intervalo de inmunogenicidad protectora de la proteína hexavalente. La prueba intraperitoneal de los ratones con el estreptococos virulento es el ensayo de laboratorio más severo para los anticuerpos opsonizantes.

En este experimento, dos grupos de diez ratones cada uno fueron tratados con un inóculo que se aproximó al LD₇₀-LD₁₀₀ para cada serotipo, que era de 2×10^4 CFU. Los experimentos prueba comenzaron 15 semanas después de que la

ES 2 280 101 T3

primera dosis de vacuna fuera administrada y las muertes fueron registradas durante 10 días. Los ratones que fueron inmunizados con la vacuna hexavalente y tratados con el estreptococo tipo 24 fueron protegidos significativamente de la muerte, comparado con el grupo testigo ($p=0001$). Los ratones desafiados con el estreptococo de tipo 19 fueron protegidos por la vacuna, pero el nivel no fue estadísticamente significativo ($p=15$). Si el tamaño del grupo de prueba hubiera sido el doble, el mismo nivel de protección habría dado como resultado una velocidad de supervivencia estadísticamente significativa. Cuando la supervivencia del grupo completo de los ratones inmunizados fue analizada, el nivel de protección fue altamente significativo ($p=0002$).

TABLA 1

Inmunogenicidad protectora de la vacuna hexavalente en los ratones que fueron tratados i.p. con el estreptococo virulento de tipo 24 y el tipo 19

N° de Muertos/ N° de Supervivientes de los ratones desafiados (%supervivencia)

Grupo	Tipo 24	Tipo 19	Total
Ratones inmunizados	0/10 (100)	4/6 (60)	4/16 (80) $p=0002^*$
Ratones testigo	9/1 (10)	7/3 (30)	16/4 (20)

* valor p fue calculado usando el ensayo exacto de Fisher.

Ejemplo 5

Ensayos para los anticuerpos de reacción cruzada de tejidos

Para asegurar que ninguna de las vacunas de la proteína M evoca los anticuerpos reactivos cruzados de tejido, los ensayos de inmunofluorescencia indirecta fueron realizados usando secciones congeladas de corazón riñón y cerebro humano, (Dale, J.B. y Beachey E.H., "Protective antigenic determinant of streptococcal M protein shared with sarcolemmal membrana protein of human heart", *J. Exp. Med.* 156:1165-1176, 1982). Las secciones finas de tejido obtenidas en la autopsia ($4 \mu\text{m}$) son preparadas en los portaobjetos del microscopio y almacenadas en una caja sellada a -700°C hasta su uso. El suero de ensayo es diluido 1:5 en PBS y depositado gota a gota en la sección del tejido. Los portaobjetos testigo son hechos con suero preinmune y PBS. Los portaobjetos son incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego lavados tres veces en PBS en un recipiente de portaobjetos. La anticuerpo de cabra anti IgG/IgM/IgA marcado con fluoresceína es diluida 1:40 en PBS y depositada gota a gota en los portaobjetos que son lavados de nuevo, secados y montados con 1% de Gelvetol y un cubreobjetos. La fluorescencia es detectada usando un microscopio Zeiss Axiophot equipado con una fuente de luz de Xenón. La inmunofluorescencia es grabada usando una escala de 0-4+, con 0 siendo no fluorescencia y 4+ siendo la fluorescencia obtenida con un antisuero estándar, positivo generado en ratones contra la proteína completa de tipo 5 M (Dale, J.B y Beachey, E.H., "Multiple heart-cross-reactive epitopes of streptococcal M proteins", *J. Exp. Med.* 161:113-122, 1985).

Ejemplo 6

Comparación de la inmunogenicidad de una vacuna hexavalente suministrada en alúmina frente al adyuvante de freund

Tres conejos fueron inmunizados cada uno con dosis de $100 \mu\text{g}$ de la vacuna hexavalente bien en alúmina o en CFA. Inyecciones de refuerzo de la misma dosis fueron dadas en 4 y 8 semanas bien en alúmina o en salino, respectivamente. Las concentraciones de ELISA fueron determinadas usando la proteína hexavalente purificada como antígeno de fase sólida (Figura 3). El suero de los animales que recibió la vacuna hexavalente en alúmina tenía concentraciones de anticuerpo que eran igual o mayores que en el suero de los conejos que recibieron la misma dosis en CFA. En un experimento subsiguiente, tres conejos fueron inmunizados I.M. con $100 \mu\text{g}$ de la vacuna hexavalente en salino solo según el mismo programa. Ninguno de estos conejos desarrolló concentraciones significativas de anticuerpos frente al inmunógeno o bien frente a las proteínas pep M respectivas (datos no mostrados). Estos datos indican que la alúmina es un adyuvante adecuado y necesario para la vacuna multivalente y es igual a la actividad adyuvante del CFA en combinación con la proteína hexavalente.

Ejemplo 7

Inmunogenicidad de las subunidades componentes de una vacuna hexavalente

5 Uno de los principales objetivos de este estudio fue el diseñar una proteína multivalente, híbrida que retuviera las propiedades inmunogénicas de cada subunidad de la proteína M. Los ELISAs fueron realizados en el suero obtenido de los tres conejos inmunizados con la vacuna hexavalente en alúmina (Figura 4). En cada caso el antígeno del ELISA fue la proteína M extraída- pepsina purificada. De esta manera, el ensayo mide sólo los anticuerpos evocados por la proteína hexavalente que reacciona con la proteína M nativa y no los anticuerpos que pueden ser específicos para los
10 segmentos de unión o las conformaciones que no están presentes en las proteínas M nativas. La proteína hexavalente evocó niveles significativos de anticuerpos contra cada proteína M representada en la construcción de la vacuna (Figura 4). En gran medida, ninguno de los antiseros contenían anticuerpos que reacción cruzada con los tejidos de corazón o tejidos de riñón humanos, como se determinó por los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (datos no mostrados).

15 El suero de los tres conejos contenía niveles significativos de anticuerpos opsonizantes contra cada serotipo del estreptococo del grupo A representados en la vacuna (Figura 5). Estos resultados fueron confirmados por ensayos bactericidas indirectos usando uno de los sueros inmunes (Tabla 2). Cogidos juntos, los resultados indican que los componentes individuales de la vacuna hexavalente retienen la conformación y la inmunogenicidad necesaria para obtener anticuerpos que reaccionen con las proteínas M nativas en la superficie de cada serotipo respectivo del estreptococo del grupo A.
20

TABLA 2

Ensayos bactericidas indirectos de antisuero de conejo contra la vacuna de proteína M hexavalente

25 CFU que sobrevivieron a 3h de rotación:

30 Serotipo	Inóculo (CFU)	Preinmune	Inmune	Porcentaje de reducción
24	12	2890	0	100
35 5	11	3260	0	100
6	6	2640	0	100
40 19	6	1580	0	100
1	8	2670	490	82
45 3	11	1720	10	99

De lo anterior se aprecia que, aunque las realizaciones del invento han sido descritas aquí con un propósito de ilustración, diversas modificaciones pueden ser hechas sin desviarse del espíritu y del alcance del invento. Por consiguiente, el invento no está limitado excepto por las reivindicaciones anexas.
50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido de fusión, que comprende: (a) una porción inmunogénica multivalente en la que la porción
inmunogénica comprende al menos dos péptidos inmunogénicos, en el que cada péptido inmunogénico comprende
al menos 10 aminoácidos, de un fragmento amino terminal de una proteína M de estreptococos del grupo A, y en el
que la porción inmunogénica multivalente es capaz de generar una respuesta inmune contra estreptococos del grupo
A; y (b) un péptido carboxilo terminal que es una reiteración de un péptido de la región amino terminal de la porción
multivalente.
- 10 2. El polipéptido de fusión según la reivindicación 1, en el que sólo un péptido inmunogénico es reiterado.
3. El polipéptido de fusión según la reivindicación 1, en el que la respuesta inmune contra estreptococos del grupo
A comprende anticuerpos opsonizantes que no reaccionan de modo entrecruzado con el tejido humano.
- 15 4. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que el polipéptido de fusión tiene al
menos un péptido inmunogénico de un serotipo de estreptococos del grupo A seleccionado del 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12,
13, 14, 18, 19, 22, 24, 28, 30, 48, 49, 52, 55, y 56.
- 20 5. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococo del grupo A del serotipo 1.
6. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 2.
- 25 7. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 3.
8. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 5.
- 30 9. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 6.
- 35 10. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 11.
11. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 12.
- 40 12. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 13.
13. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 14.
- 45 14. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 18.
- 50 15. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 19.
16. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 22.
- 55 17. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 24.
18. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que al menos uno de los péptidos
inmunogénicos es de estreptococos del grupo A del serotipo 28.
- 60 19. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la porción inmunogénica
consiste en seis a diez péptidos inmunogénicos.
- 65 20. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la porción inmunogénica
consiste de seis péptidos inmunogénicos.

ES 2 280 101 T3

21. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 19-20, en el que cada péptido inmunogénico de la porción inmunogénica es de un serotipo de estreptococos del grupo A diferente.
- 5 22. El polipéptido de fusión según la reivindicación 21, en el que los serotipos son 1, 3, 5, 6, 19, y 24.
23. El polipéptido de fusión según la reivindicación 21, en el que los serotipos son 1, 3, 5, 6, 18, 19, 22, 24, 28 y 30.
- 10 24. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-23, en el que los polipéptidos inmunogénicos del polipéptido de fusión están unidos por aminoácidos codificados por un sitio de enzima de restricción.
25. El polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-24, que comprende además un marcador.
- 15 26. El polipéptido de fusión según la reivindicación 25, en el que el marcador es capaz de unirse a una resina de níquel.
27. Una composición, que comprende un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones de 1-26, y un excipiente, vehículo, estabilizador o diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 20 28. La composición según la reivindicación 27, que comprende además un adyuvante.
29. La composición según la reivindicación 28 en la que el adyuvante es alúmina o adyuvante de Freund.
- 25 30. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 27-29, que comprende además un cofactor inmunomodulador.
31. La composición según la reivindicación 30 en la que el cofactor inmunomodulador es seleccionado del grupo que consiste de IL-4, IL-10, Y-IFN, IL-2, IL-12 e IL-15.
- 30 32. Un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-26, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 27-31, para uso terapéutico.
- 35 33. El uso de un polipéptido de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1-26, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 27-31, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las infecciones de estreptococos del grupo A.
34. El uso según la reivindicación 33, en el que dicho polipéptido de fusión o composición obtiene anticuerpos opsonizantes.
- 40 35. El uso según la reivindicación 34 en el que dichos anticuerpos opsonizantes no reaccionan de modo entrecruzado con el tejido hospedante.

45

50

55

60

65

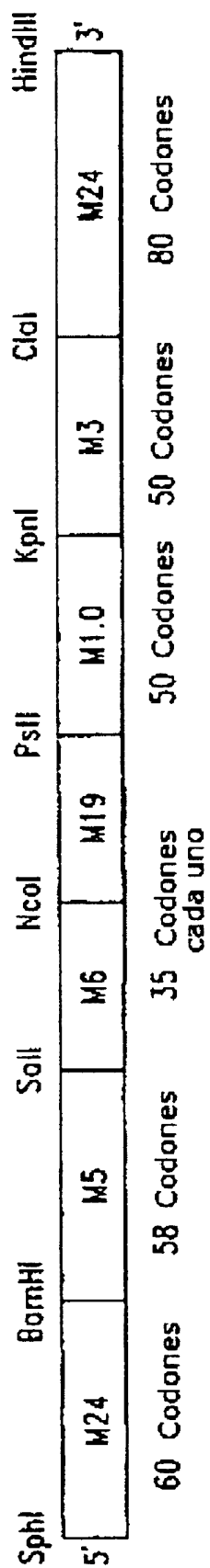


Fig. 1

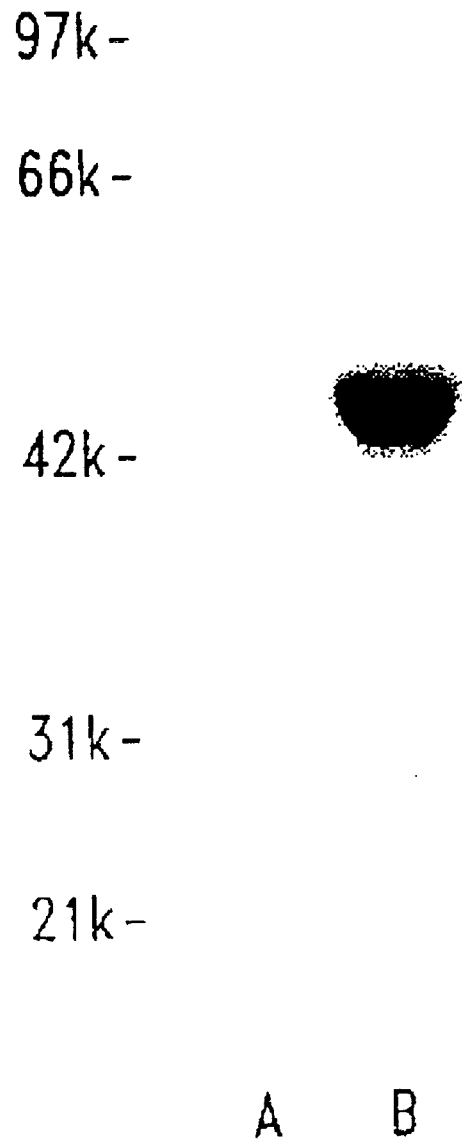


Fig. 2

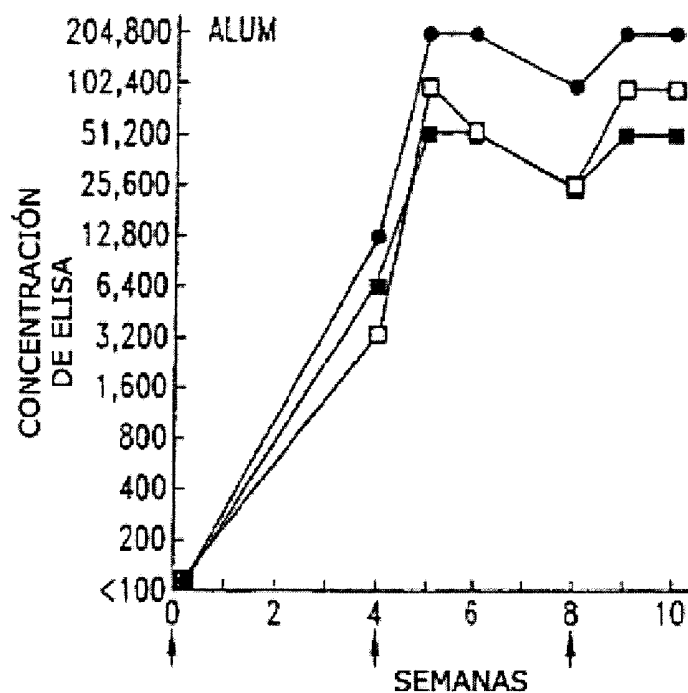


Fig. 3A

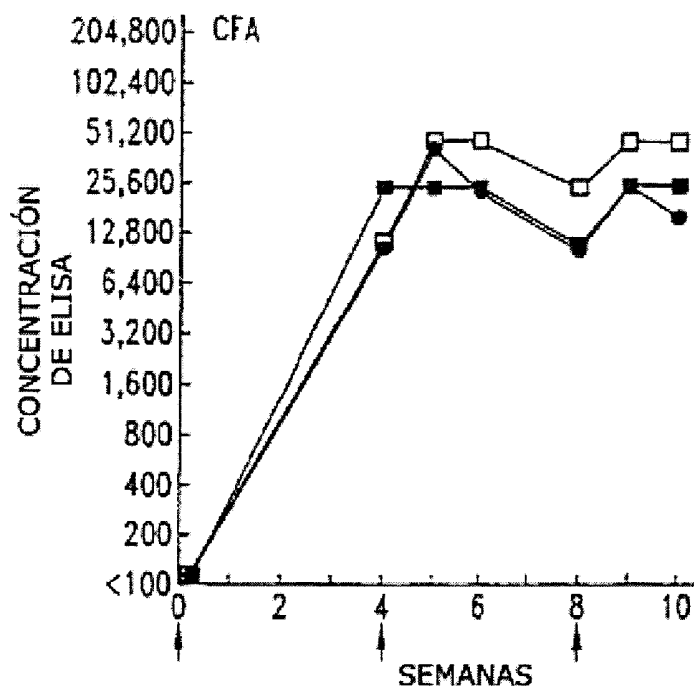


Fig. 3B

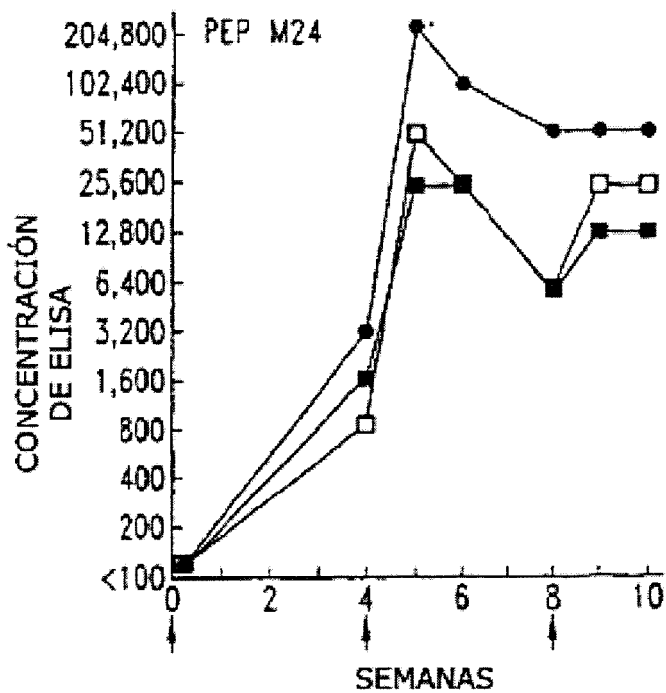


Fig. 4A

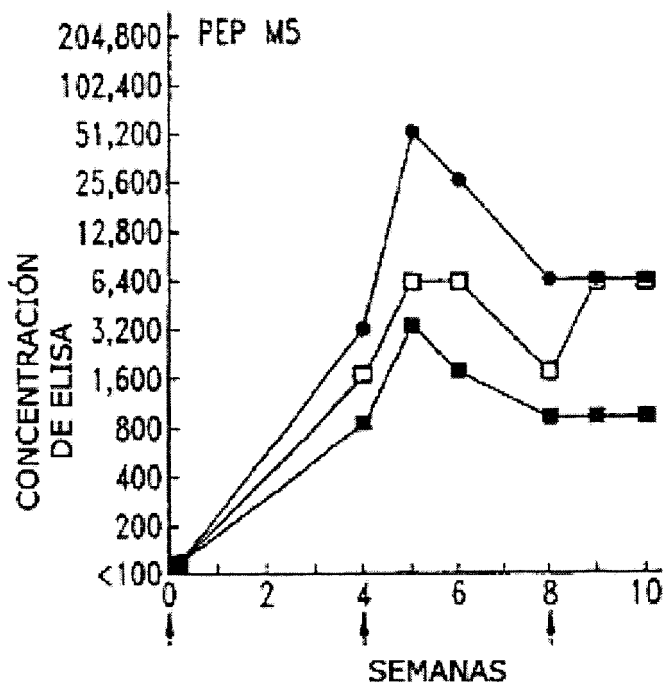


Fig. 4B

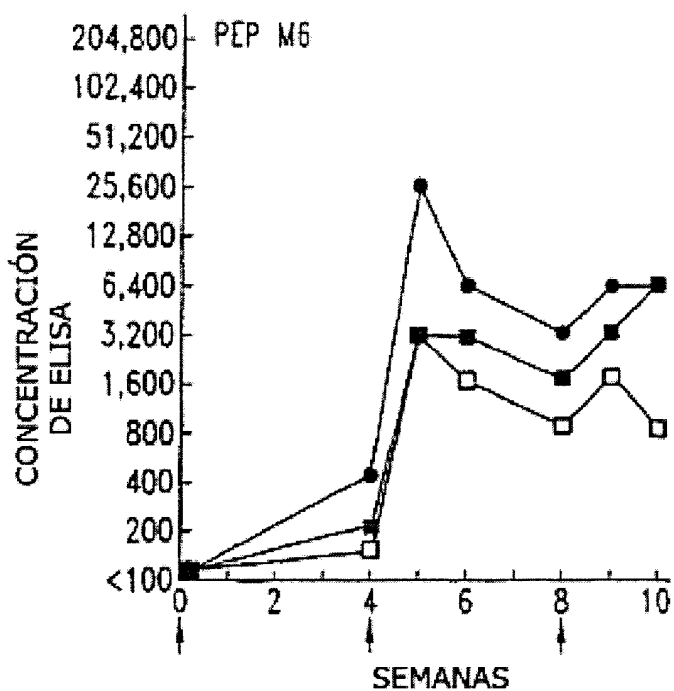


Fig. 4C

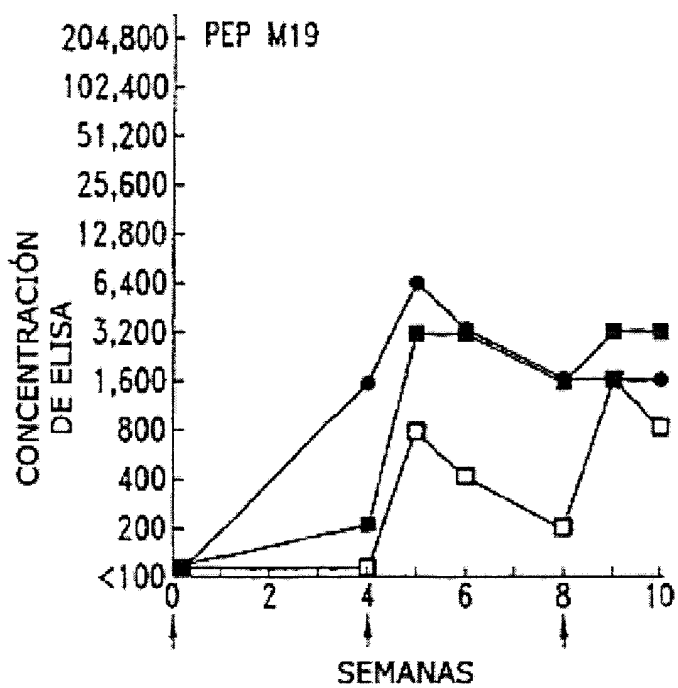


Fig. 4D

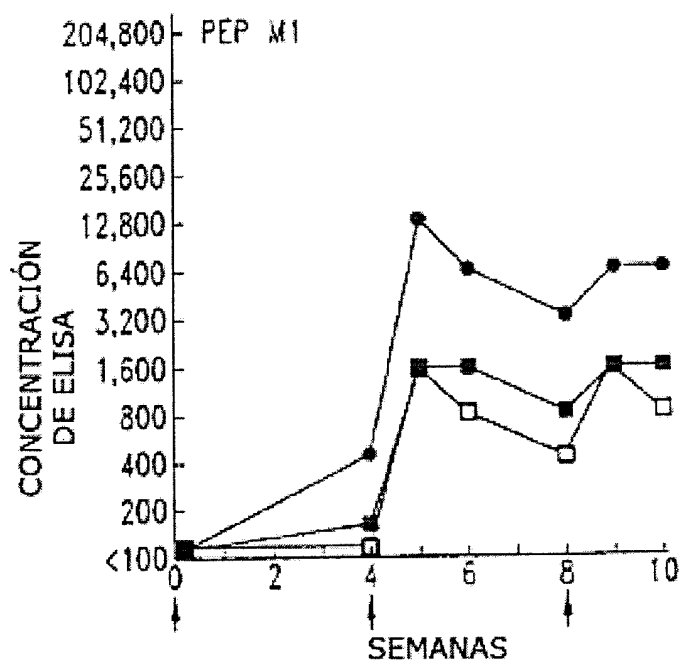


Fig. 4E

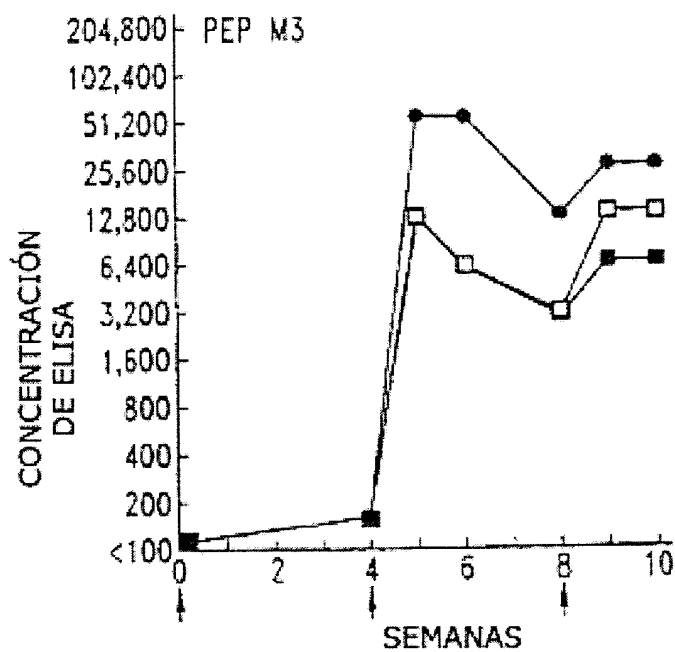


Fig. 4F

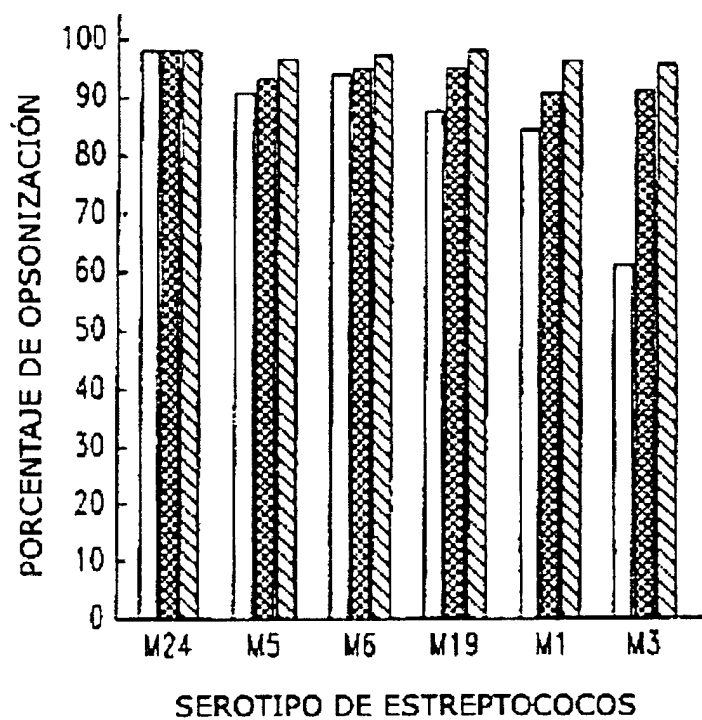


Fig. 5

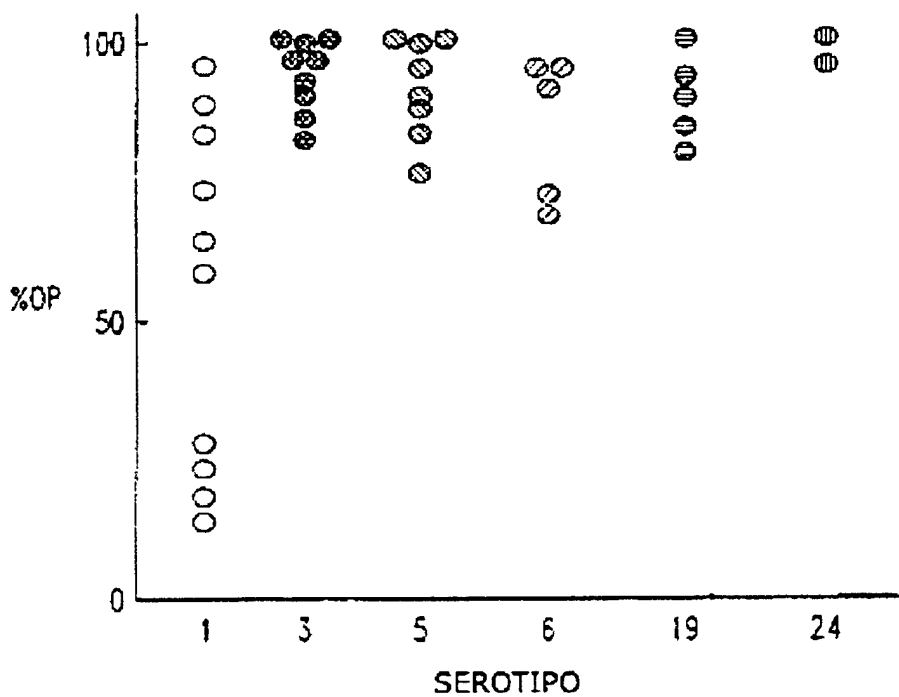


Fig. 6

SECUENCIA DE LA VACUNA DE PROTEÍNA M HEXAVALENTE

```

      10      20      30      40      50      60      70
      *      *      *      *      *      *      *
GCA TGC ATG GTC GCG ACT AGG TCT CAG ACA GAT ACT CTG GAA AAA GTA CAA GAA CGT CCT GAC AAG TTT GAG ATA
Ala Cys Met Val Ala Thr Arg Ser Gln Thr Asp Thr Leu Glu Lys Val Gln Glu Arg Ala Asp Lys Phe Glu Ile
-SphI- M24----->

      80      90      100      110      120      130      140      150
      *      *      *      *      *      *      *      *
GAA AAC AAT ACG TTA AAA CTT AAG AAT AGT GAC TTA AGT TTT AAT AAT AAA GCG TTA AAA GAT CAT AAT GAT GAG
Glu Asn Asn Thr Leu Lys Leu Lys Asn Ser Asp Leu Ser Phe Asn Asn Lys Ala Leu Lys Asp His Asn Asp Glu

      160      170      180      190      200      210      220
      *      *      *      *      *      *      *
TTA ACT GAA GAG TTG AGT AAT GCT AAA GAG AAA CTA CGT GGA TCC GGC GTG ACT AGG CGT ACA ATA AAT GAC CCG
Leu Thr Glu Glu Leu Ser Asn Ala Lys Glu Lys Leu Arg Gly Ser Ala Val Thr Arg Gly Thr Ile Asn Asp Pro
-BamHI- M5----->

      230      240      250      260      270      280      290      300
      *      *      *      *      *      *      *      *
CAA AGA GCA AAA GAA GGT CTT GAC AAG TAT GAG CTA GAA AAC CAT GAC TTA AAA ACT AAG AAT GAA GGG TTA AAA
Gln Arg Ala Lys Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Glu Leu Glu Asn His Asp Leu Lys Thr Lys Asn Glu Gly Leu Lys

      310      320      330      340      350      360      370
      *      *      *      *      *      *      *
ACT GAG AAT GAA GGG TTA AAA ACT GAG AAT GAA GGG TTA AAA ACT GAG AAT GAA GGG TTA AAA ACT GAG GTC GAC
Thr Glu Asn Glu Gly Leu Lys Thr Glu Asn Glu Gly Leu Lys Thr Glu Asn Glu Gly Leu Lys Thr Glu Val Asp
-SalI-

      380      390      400      410      420      430      440      450
      *      *      *      *      *      *      *      *
AGA GTG TTT CCT ACG GGG ACG GTA GAA AAC CCG GAC AAA GCA CGA GAA CTT CTT AAC AAG TAT GAC GTA GAG AAC
Arg Val Phe Pro Arg Gly Thr Val Glu Asn Pro Asp Lys Ala Arg Glu Leu Leu Asn Lys Tyr Asp Val Glu Asn
M6----->

      460      470      480      490      500      510      520
      *      *      *      *      *      *      *
TCT ATG TTA CAA GCT AAT AAT GAC AAG TTA CCA TGG AGA GTG CGT TAT ACT AGG CAT ACG CCA GAA GAT AAG CTA
Ser Met Leu Gln Ala Asn Asn Asp Lys Leu Pro Trp Arg Val Arg Tyr Thr Arg His Thr Pro Glu Asp Lys Leu
-NcoI- M19----->

      530      540      550      560      570      580      590      600
      *      *      *      *      *      *      *      *
AAA AAA ATT ATT GAC GAT CTT GAC GCA AAA GAA CAT GAA TTA CAA CAA CAG AAT GAG AAG TTA TCT CTG CAG AAC
Lys Lys Ile Ile Asp Asp Leu Asp Ala Lys Glu His Glu Leu Gln Gln Gln Asn Glu Lys Leu Ser Leu Gln Asn
-PstI- M10

      610      620      630      640      650      660      670
      *      *      *      *      *      *      *
GGT GAT GST AAT CCT ACG GAA GTT ATA GAA GAT CTT GCA GCA AAC AAT CCC GCA ATA CAA AAT ATA CGT TTA CGT
Gly Asp Gly Asn Pro Arg Glu Val Ile Glu Asp Leu Ala Ala Asn Asn Pro Ala Ile Gln Asn Ile Arg Leu Arg
----->

```

Fig. 7A

ES 2 280 101 T3

```

      680      690      700      710      720      730      740      750
      *      *      *      *      *      *      *      *
CAC GAA AAG AAG GAC TTA AAA GCG AGA TTA GAG AAT GCA ATG GAA GTT GCA GGA AGA GAT TTT AAG AGA GCT GGT
His Glu Asn Lys Asp Leu Lys Ala Arg Leu Glu Asn Ala Met Glu Val Ala Gly Arg Asp Phe Lys Arg Ala Gly
                                                                    KpnI

      760      770      780      790      800      810      820
      *      *      *      *      *      *      *
AGC TTG TTA GAT CAG GTT ACA CAA TTA TAT ACT AAA CAT AAT AGT AAT TAC CAA CAA TAT AAT GCA CAA GCT GGC
Thr Leu Leu Asp Gln Val Thr Gln Leu Tyr Thr Lys His Asn Ser Asn Tyr Gln Gln Tyr Asn Ala Gln Ala Gly
---- M3----->

      830      840      850      860      870      880      890      900
      *      *      *      *      *      *      *      *
AGA GTT GAC CTG AGA CAA AAG GCT GAA TAT CTA AAA GGC CTT AAT GAT TGG GCT GAG AGG CTG TTA CAA GAG TTA
Arg Leu Asp Leu Arg Gln Lys Ala Glu Tyr Leu Lys Gly Leu Asn Asp Trp Ala Glu Arg Leu Leu Gln Glu Leu

      910      920      930      940      950      960      970
      *      *      *      *      *      *      *
AAT ATC GAT GTC GCG ACT AGS TCT CAG ACA GAT ACT CTG GAA AAA GTA CAA GAA CGT GCT GAC AAG TTT GAG ATA
Asn Ile Asp Val Ala Thr Arg Ser Gln Thr Asp Thr Leu Glu Lys Val Gln Glu Arg Ala Asp Lys Phe Glu Ile
-Clal- M24----->

      980      990      1000      1010      1020      1030      1040      1050
      *      *      *      *      *      *      *      *
GAA AAC AAT AGC TTA AAA CTT AAG AAT AGT GAC TTA AGT TTT AAT AAT AAA GCG TTA AAA GAT CAT AAT GAT GAG
Glu Asn Asn Thr Leu Lys Leu Lys Asn Ser Asp Leu Ser Phe Asn Asn Lys Ala Leu Lys Asp His Asn Asp Glu

      1060      1070      1080      1090      1100      1110      1120
      *      *      *      *      *      *      *
TTA ACT GAA GAG TTG AGT AAT GCT AAA GAG AAA CTA CGT AAA AAT GAT AAA TCA CTA TCT GAA AAA GCT AGT AAA
Leu Thr Glu Glu Leu Ser Asn Ala Lys Glu Lys Leu Arg Lys Asn Asp Lys Ser Leu Ser Glu Lys Ala Ser Lys

      1130      1140      1150
      *      *      *
ATT CAA GAA TTA GAG GCA CGT AAG TAA AAG CTT
Ile Gln Glu Leu Glu Ala Arg Lys *** Lys Leu
                                Stop HindIII

```

Fig. 7B

ES 2 280 101 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Dale. James B
- (ii) TÍTULO DEL INVENTO: VACUNAS DE ESTREPTOCOCOS DE GRUPO A
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 16
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: SEED and BERRY LLP
 - 15 (B) CALLE: 6300 Columbia Center, 701 Fifth Avenue
 - (C) CIUDAD: Seattle
 - (D) ESTADO: Washington
 - (E) PAÍS: EEUU
 - 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 98104
- (v) FORMA DE LECTURA POR ORDENADOR:
- (A) TIPO MEDIO: disquette
 - 25 (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: Patent In Release N° 1.0. Versión N° 1.30
- 30 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE LA SOLICITUD: US
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 12-SEPT-1997
 - 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: McMasters, David D.
 - 40 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 33.963
 - (C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: 481112.410P1
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
- 45 (A) TELÉFONO: (206) 622-4900
 - (B) TELEFAX: (206) 682-6031

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 1:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
 - (B) TIPO: ácidos nucleicos
 - 55 (C) TIPO DE HEBRA: única
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 1:
- 60 GGGGGGGCAT CGGTCGCGAC TAGGTCTCAG ACAGAT 36

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 2:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
 - (B) TIPO: ácidos nucleicos

ES 2 280 101 T3

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 2:

5

GGGGGGGGAT CCACGTAGTT TCTCTTTAGC

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 3:

10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

15

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 3:

20

GGGGGGGGAT CCGCCGTGAC TAGGGGTACA

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 4:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

30

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 4:

35

GGGGGGGTCG ACCTCAGTTT TTAACCCTTC

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 5:

40

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

45

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 5:

50

GGGGGGGTCG ACAGAGTGTT TCCTAGGGGG

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 6:

55

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

60

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 6:

65

GGGGGGCCAT GGTAACCTTGT CATTATTAGC

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 7:

ES 2 280 101 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácidos nucleicos
- (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 7:

GGGGGGCCAT GGAGAGTGCG TTATACCTAGG

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácidos nucleicos
- (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 8:

GGGGGGCTGC AGAGATAACT TCTCATTCTG

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácidos nucleicos
- (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 9:

GGGGGGCTGC AGAACGGTGA TGGTAATCCT

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácidos nucleicos
- (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 10:

GGGGGGGGTA CCAGCTCTCT TAAAATCTCT

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 pares de bases
- (B) TIPO: ácidos nucleicos
- (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 11:

ES 2 280 101 T3

GGGGGGGGTA CCTTGTTAGA TCAGGTTACA

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 12:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

10

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 12:

15

GGGGGGATCG ATATTAACT CTTGTAACAG

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 13:

20

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

25

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 13:

30

GGGGGGATCG ATGTCGCGAC TAGGTCTCAG

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 14:

35

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

40

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 14:

45

GGGGGGAAGC TTTTACTTAC GTGCCTCTAATTC

33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 15:

50

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1158 pares de bases

(B) TIPO: ácidos nucleicos

55

(C) TIPO DE HEBRA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

60

(B) LOCALIZACIÓN: 1..1149

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 15:

65

ES 2 280 101 T3

5	GCA TGC ATG GTC GCG ACT AGG TCT CAG ACA GAT ACT CTG GAA AAA GTA Ala Cys Met Val Ala Thr Arg Ser Gln Thr Asp Thr Leu Glu Lys Val	48
	1 5 10 15	
10	CAA GAA CGT GCT GAC AAG TTT GAG ATA GAA AAC AAT ACG TTA AAA CTT Gln Glu Arg Ala Asp Lys Phe Glu Ile Glu Asn Asn Thr Leu Lys Leu	96
	20 25 30	
15	AAG AAT AGT GAC TTA AGT TTT AAT AAT AAA GCG TTA AAA GAT CAT AAT Lys Asn Ser Asp Leu Ser Phe Asn Asn Lys Ala Leu Lys Asp His Asn	144
	35 40 45	
20	GAT GAG TTA ACT GAA GAG TTG AGT AAT GCT AAA GAG AAA CTA CGT GGA Asp Glu Leu Thr Glu Glu Leu Ser Asn Ala Lys Glu Lys Leu Arg Gly	192
	50 55 60	
25	TCC GCC GTG ACT AGG GGT ACA ATA AAT GAC CCG CAA AGA GCA AAA GAA Ser Ala Val Thr Arg Gly Thr Ile Asn Asp Pro Gln Arg Ala Lys Glu	240
	65 70 75 80	
30	GCT CTT GAC AAG TAT GAG CTA GAA AAC CAT GAC TTA AAA ACT AAG AAT Ala Leu Asp Lys Tyr Glu Leu Glu Asn His Asp Leu Lys Thr Lys Asn	288
	85 90 95	
35	GAA GGG TTA AAA ACT GAG AAT GAA GGG TTA AAA ACT GAG AAT GAA GGG Glu Gly Leu Lys Thr Glu Asn Glu Gly Leu Lys Thr Glu Asn Glu Gly	336
	100 105 110	
40	TTA AAA ACT GAG AAT GAA GGG TTA AAA ACT GAG GTC GAC AGA GTG TTT Leu Lys Thr Glu Asn Glu Gly Leu Lys Thr Glu Val Asp Arg Val Phe	384
	115 120 125	
45	CCT AGG GGG ACG GTA GAA AAC CCG GAC AAA GCA CGA GAA CTT CTT AAC Pro Arg Gly Thr Val Glu Asn Pro Asp Lys Ala Arg Glu Leu Leu Asn	432
50		
55		
60		
65		

ES 2 280 101 T3

	130	135	140	
5	AAG TAT GAC GTA GAG AAC TCT ATG TTA CAA GCT AAT AAT GAC AAG TTA Lys Tyr Asp Val Glu Asn Ser Met Leu Gln Ala Asn Asn Asp Lys Leu 145	150	155	160 480
10	CCA TGG AGA GTG CGT TAT ACT AGG CAT ACG CCA GAA GAT AAG CTA AAA Pro Trp Arg Val Arg Tyr Thr Arg His Thr Pro Glu Asp Lys Leu Lys 165	170	175	528
15	AAA ATT ATT GAC GAT CTT GAC GCA AAA GAA CAT GAA TTA CAA CAA CAG Lys Ile Ile Asp Asp Leu Asp Ala Lys Glu His Glu Leu Gln Gln Gln 180	185	190	576
20	AAT GAG AAG TTA TCT CTG CAG AAC GGT GAT GGT AAT CCT AGG GAA GTT Asn Glu Lys Leu Ser Leu Gln Asn Gly Asp Gly Asn Pro Arg Glu Val 195	200	205	624
25	ATA GAA GAT CTT GCA GCA AAC AAT CCC GCA ATA CAA AAT ATA CGT TTA Ile Glu Asp Leu Ala Ala Asn Asn Pro Ala Ile Gln Asn Ile Arg Leu 210	215	220	672
30	CGT CAC GAA AAC AAG GAC TTA AAA GCG AGA TTA GAG AAT GCA ATG GAA Arg His Glu Asn Lys Asp Leu Lys Ala Arg Leu Glu Asn Ala Met Glu 225	230	235	240 720
35	GTT GCA GGA AGA GAT TTT AAG AGA GCT GGT ACC TTG TTA GAT CAG GTT Val Ala Gly Arg Asp Phe Lys Arg Ala Gly Thr Leu Leu Asp Gln Val 245	250	255	768
40	ACA CAA TTA TAT ACT AAA CAT AAT AGT AAT TAC CAA CAA TAT AAT GCA Thr Gln Leu Tyr Thr Lys His Asn Ser Asn Tyr Gln Gln Tyr Asn Ala 260	265	270	816
45	CAA GCT GGC AGA CTT GAC CTG AGA CAA AAG GCT GAA TAT CTA AAA GGC Gln Ala Gly Arg Leu Asp Leu Arg Gln Lys Ala Glu Tyr Leu Lys Gly 275	280	285	864
50	CTT AAT GAT TGG GCT GAG AGG CTG TTA CAA GAG TTA AAT ATC GAT GTC Leu Asn Asp Trp Ala Glu Arg Leu Leu Gln Glu Leu Asn Ile Asp Val 290	295	300	912
55	GCG ACT AGG TCT CAG ACA GAT ACT CTG GAA AAA GTA CAA GAA CGT GCT Ala Thr Arg Ser Gln Thr Asp Thr Leu Glu Lys Val Gln Glu Arg Ala 305	310	315	320 960
60				
65				

ES 2 280 101 T3

5 GAC AAG TTT GAG ATA GAA AAC AAT ACG TTA AAA CTT AAG AAT AGT GAC 1008
 Asp Lys Phe Glu Ile Glu Asn Asn Thr Leu Lys Leu Lys Asn Ser Asp
 325 330 335

10 TTA AGT TTT AAT AAT AAA GCG TTA AAA GAT CAT AAT GAT GAG TTA ACT 1056
 Leu Ser Phe Asn Asn Lys Ala Leu Lys Asp His Asn Asp Glu Leu Thr
 340 345 350

15 GAA GAG TTG AGT AAT GCT AAA GAG AAA CTA CGT AAA AAT GAT AAA TCA 1104
 Glu Glu Leu Ser Asn Ala Lys Glu Lys Leu Arg Lys Asn Asp Lys Ser
 355 360 365

20 CTA TCT GAA AAA GCT AGT AAA ATT CAA GAA TTA GAG GCA CGT AAG 1149
 Leu Ser Glu Lys Ala Ser Lys Ile Gln Glu Leu Glu Ala Arg Lys
 370 375 380

25 TAAAAGCTT 1158

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID N°: 16:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 383 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácidos
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID N°: 16:

40 Ala Cys Met Val Ala Thr Arg Ser Gln Thr Asp Thr Leu Glu Lys Val
 1 5 10 15

45 Gln Glu Arg Ala Asp Lys Phe Glu Ile Glu Asn Asn Thr Leu Lys Leu
 20 25 30

50 Lys Asn Ser Asp Leu Ser Phe Asn Asn Lys Ala Leu Lys Asp His Asn
 35 40 45

55 Asp Glu Leu Thr Glu Glu Leu Ser Asn Ala Lys Glu Lys Leu Arg Gly
 50 55 60

60 Ser Ala Val Thr Arg Gly Thr Ile Asn Asp Pro Gln Arg Ala Lys Glu
 65 70 75 80

65

ES 2 280 101 T3

Asp Lys Phe Glu Ile Glu Asn Asn Thr Leu Lys Leu Lys Asn Ser Asp
325 330 335

5

Leu Ser Phe Asn Asn Lys Ala Leu Lys Asp His Asn Asp Glu Leu Thr
340 345 350

10

Glu Glu Leu Ser Asn Ala Lys Glu Lys Leu Arg Lys Asn Asp Lys Ser
355 360 365

15

Leu Ser Glu Lys Ala Ser Lys Ile Gln Glu Leu Glu Ala Arg Lys
370 375 380

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65