



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 627**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 14/21 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02779066 .6**

96 Fecha de presentación : **15.11.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1444349**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2004**

54 Título: **Polipéptidos de *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*.**

30 Prioridad: **16.11.2001 US 331441 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73 Titular/es: **ID Biomedical Corporation**
525 Cartier Boulevard West
Laval, QC H7V 3S8, CA

72 Inventor/es: **Martin, Denis;**
Hamel, Josée;
Brodeur, Bernard, R.;
Rioux, Stéphane y
Couture, Julie

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Polipéptidos de *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a con polipéptidos, más particularmente con el polipéptido SHB-MC100 de *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*, que puede usarse para prevenir, diagnosticar y/o tratar la infección por *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*.

10 **Antecedentes de la invención**

Moraxella (Branhamella) catarrhalis es un diplococo gramnegativo que produce infecciones del tracto respiratorio. En la actualidad *M. catarrhalis* está aceptada como la tercera causa más frecuente de otitis media en lactantes y niños, después de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. *M. catarrhalis* también se ha asociado con otros diversos tipos de infección, incluidos sinusitis, tos persistente y laringitis aguda.

Dado que aproximadamente el 90% de las cepas de *M. catarrhalis* son resistentes a los antibióticos (son beta lactamasa positivas) y que la otitis media recurrente está asociada con una elevada morbilidad, existe una necesidad de desarrollar una vacuna que proteja a los individuos de la infección por *M. catarrhalis*. Una infección por *M. catarrhalis* induce una respuesta inmunitaria contra los antígenos que se encuentran sobre la superficie de las células bacterianas. No obstante, muchas de estas proteínas de superficie no están caracterizadas todavía ni tampoco se ha determinado la respuesta inmunitaria que tiene como resultado la protección de la infección producida por diferentes cepas.

El documento WO 00/78968 desvela secuencias nucleotídicas del genoma de *Moraxella catarrhalis*.

Para desarrollar una vacuna que proteja a los individuos de la infección producida por *M. catarrhalis*, los esfuerzos se han concentrado principalmente en las proteínas de la membrana externa tales como la proteína de masa molecular elevada denominada proteína de superficie A ubicua. Esta proteína se considera una prometedora candidata a vacuna porque en el estudio de aclaramiento pulmonar en murinos se demostró que tanto un anticuerpo monoclonal como anticuerpos policlonales eran bactericidas y protectores. No obstante, se demostró que esta proteína era altamente variable entre las diferentes cepas de *M. catarrhalis*. Además de esta proteína, otras proteínas de *M. catarrhalis* han generado interés como posibles candidatos a vacunas. La proteína de unión a la transferrina, que posee epítomos conservados, se expuso en la superficie bacteriana. No obstante, existía una divergencia en el grado de reactividad cruzada de anticuerpos con la proteína de una cepa a otra. Otros investigadores también se han centrado en la proteína CD de 45 kDa (OMP CD). Esta proteína está altamente conservada entre las cepas de *M. catarrhalis*, no obstante los adultos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica muestran variabilidad en la respuesta inmunitaria contra la OMP CD.

Por tanto, existe una necesidad no satisfecha de polipéptidos de *M. catarrhalis* que se puedan usar para prevenir, diagnosticar y/o tratar la infección producida por *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*.

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un polinucleótido aislado constituido por una secuencia nucleotídica que es idéntica en al menos un 80% a la secuencia nucleotídica que se expone en la SEC ID N° 1, en la que el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria a *Moraxella catarrhalis* y que tiene la capacidad de producir anticuerpos que poseen especificidad por un polipéptido compuesto por la secuencia aminoacídica expuesta en la SEC ID N° 2.

En la presente memoria descriptiva también se desvela un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 70% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos de las mismas.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 80% a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 2, en el que el polipéptido aislado tiene la agilidad de provocar una respuesta inmunitaria a *Moraxella catarrhalis* y tiene la capacidad de producir anticuerpos que tienen especificidad por un polipéptido compuesto por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 2.

En la presente memoria descriptiva también se describen polipéptidos que comprenden una secuencia de la SEC ID N° 4 o fragmentos o análogos de los mismos.

En otros aspectos se proporcionan polipéptidos codificados por polinucleótidos de la invención como se desvelan en las reivindicaciones adjuntas, composiciones farmacéuticas, vectores que comprenden polinucleótidos de la invención unidos operablemente a una región de control de la expresión, así como células huésped transfeccionadas con dichos vectores y procedimientos para producir polipéptidos que comprenden cultivar dichas células huésped en condiciones adecuadas para la expresión.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa la secuencia de ADN del gen SHB-MC100 de la cepa de *M. catarrhalis* ETSU C-2; SEC ID N° 1. La porción subrayada de la secuencia representa la región que codifica el péptido líder.

La figura 2 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido SHB-MC100 de la cepa de *M. catarrhalis* ETSU C-2; SEC ID N°:2. La secuencia subrayada representa el péptido líder de 15 residuos aminoácídicos.

La Figura 3 representa la secuencia de ADN del gen SHB-MC101 de la cepa de *M. catarrhalis* ETSU C-2; SEC ID N°:3. La porción subrayada de la secuencia representa la región codificadora del péptido líder.

La figura 4 representa la secuencia de aminoácidos del polipéptido SHB-MC101 de la cepa de *M. catarrhalis* ETSU C-2; SEC ID N°:4. La secuencia subrayada representa el péptido líder de 20 residuos aminoácídicos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona polinucleótidos purificados y aislados, que codifican polipéptidos de *Moraxella* que se pueden usar para prevenir, diagnosticar y/o tratar la infección producida por *Moraxella*. Estos polinucleótidos son como se definen en las reivindicaciones adjuntas.

En la presente memoria descriptiva también se desvelan: un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 70% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos del mismo; un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 80% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos del mismo; un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 90% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos del mismo; un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 95% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos del mismo; un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 98% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos del mismo; un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 70% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4; un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 80% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4; un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 90% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4; un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 95% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4; un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 98% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2 o 4.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID N°: 2 o fragmentos o análogos de la misma, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID N°: 2.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos caracterizados por la secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID N°: 2 o fragmentos o análogos de la misma, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos caracterizados por la secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID N°: 2.

En la presente memoria descriptiva también se desvela un polinucleótido que codifica un epítipo que lleva la porción de un polipéptido que comprende la secuencia escogida de SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos de las mismas.

En la presente memoria descriptiva también se desvelan epítipos que llevan porciones de un polipéptido que comprende la secuencia escogida de SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos de las mismas.

En la presente memoria descriptiva también se desvela un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido escogido de: polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido seleccionado de:

- (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 70% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de: SEQ ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos de las mismas;

ES 2 316 627 T3

(b) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 80% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de: SEQ ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos de las mismas;

(c) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 95% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de: SEQ ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos de las mismas;

(d) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia escogida de: SEQ ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos de las mismas;

(e) los polipéptidos de la invención son como se define en las reivindicaciones adjuntas y codifican un polipéptido capaz de producir anticuerpos que poseen especificidad de unión por un polipéptido que comprenden una secuencia escogida de: SEQ ID N°: 2.

En la presente memoria descriptiva también se desvela:

(f) un polipéptido que codifica un epítipo que lleva una porción de un polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos de las mismas.

La presente invención proporciona

(g) un polinucleótido compuesto por una secuencia escogida de la SEC ID N°: 1 o fragmentos o análogos de la misma, como se define en las reivindicaciones adjuntas;

(h) un polinucleótido que es complementario a un polinucleótido de la invención; p. ej., (e) o (g). En la presente memoria descriptiva también se desvelan polinucleótidos que son complementarios a (a) a (d) o (f).

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende un polipéptido escogido de:

(a) un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 80% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia expuesta en la SEC ID N°: 2 o fragmentos o análogos de la misma, como se define en las reivindicaciones adjuntas;

(b) un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 95% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia expuesta en la SEC ID N°: 2 o fragmentos o análogos de la misma, como se define en las reivindicaciones adjuntas;

(c) un polipéptido que comprende una secuencia expuesta en la SEC ID N°: 2 o fragmentos o análogos de la misma, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

(d) como se define en las reivindicaciones adjuntas, los polipéptidos de la invención son capaces de producir anticuerpos que tienen especificidad de unión a un polipéptido que comprende una secuencia escogida de la SEC ID N°: 2;

En la presente memoria descriptiva también se desvela:

(e) un epítipo que lleva una porción de un polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos de las mismas;

La presente invención proporciona

(f) el polipéptido de (a), (b), (c), (d) o (e), en el que el residuo Met en el extremo N 'se ha eliminado;

(g) el polipéptido de (a), (b), (c), (d), (e) o (f), en el que la secuencia de aminoácidos secretorios 'se ha eliminado.

En la presente memoria descriptiva también se desvela un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 70% con un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos de las mismas.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención incluye moléculas de ADN, es decir polinucleótidos, genes, sus genes homólogos y sus secuencias complementarias que codifican análogos tales como mutantes, variantes, homólogos y derivados de tales polipéptidos en cuando a que éstos están abarcados en la reivindicaciones adjuntas, como se describe en la presente memoria descriptiva en la presente solicitud de patente. La invención también incluye moléculas de ARN correspondientes a las moléculas de ADN de la invención. Además de las moléculas de ADN y ARN, la invención incluye los polipéptidos correspondientes y anticuerpos monoespecíficos que se unen específicamente a tales polipéptidos.

La presente invención se refiere a polipéptidos que son antigénicos.

La presente invención se refiere a polipéptidos que son inmunogénicos.

Como se define en las reivindicaciones adjuntas, el polipéptido de acuerdo con la presente invención puede provocar una respuesta inmunitaria en un huésped y son capaces de producir anticuerpos que poseen especificidad de unión a los polipéptidos de la presente invención como se ha definido en lo que antecede.

Un anticuerpo que “posee especificidad de unión” es un anticuerpo que reconoce y se une al polipéptido seleccionado pero que no reconoce sustancialmente y se une a otras moléculas en una muestra, por ejemplo una muestra biológica. La unión específica se puede medir usando un ensayo ELISA en el que el polipéptido seleccionado se usa como antígeno.

De acuerdo con la presente invención, en los estudios biológicas “protección” se define por un incremento significativo en la curva, tasa o periodo de supervivencia. El análisis estadístico usando la prueba del orden logarítmico para comparar curvas de supervivencia y la prueba exacta de Fisher para comparar las tasas de supervivencia y el número de días hasta la muerte, respectivamente, podría ser útil para calcular los valores P y determinar si la diferencia entre los dos grupos es estadísticamente significativa. Valores P de 0,05 se consideran no significativos.

En un aspecto adicional de la invención se proporcionan fragmentos antigénicos/inmunogénicos de los polipéptidos de la invención, o análogos de los mismos, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Los fragmentos de la presente invención deberían incluir una o más de tales regiones epitópicas o ser suficientemente similares a dichas regiones para conservar sus propiedades antigénicas/inmunogénicas. Por tanto, para fragmentos de acuerdo con la presente invención el grado de identidad es, quizá, irrelevante, ya que pueden ser idénticos en un 100% a una parte concreta de un polipéptido o análogo del mismo como se describe en la presente memoria descriptiva. La presente invención además proporciona formas de realización como se define en las reivindicaciones adjuntas, que comprende fragmentos que tienen al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos de las secuencias polipeptídicas de la presente invención. En una forma de realización, al menos 15 residuos de aminoácidos contiguos. En una forma de realización, al menos 20 residuos de aminoácidos contiguos.

El experto apreciará que los análogos de los polipéptidos de la invención también serán útiles en el contexto de la presente invención, es decir como material antigénico/inmunogénico. Por tanto, por ejemplo, proteínas o polipéptidos que incluyen una o más adiciones, deleciones, sustituciones o similares están dentro de la presente invención, en cuanto a que quedan abarcadas en las reivindicaciones adjuntas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, “fragmentos”, “análogos” o “derivados” de los polipéptidos de la invención incluyen los polipéptidos en los que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente conservado) y que puede ser natural o no natural y que están dentro de las reivindicaciones adjuntas. En un ejemplo de la descripción, los derivados y análogos de polipéptidos de la invención tendrán una identidad de aproximadamente un 70% con las secuencias ilustradas en las figuras o fragmentos de las mismas. Es decir, el 70% de los residuos son los mismos. En otra forma de realización de la invención, los polipéptidos tendrán una identidad mayor del 80%. En otra forma de realización, los polipéptidos tendrán una identidad mayor del 85%. En otra forma de realización, los polipéptidos tendrán una identidad mayor del 90%. En otra forma de realización, los polipéptidos tendrán una identidad mayor del 95%. En otra forma de realización, los polipéptidos tendrán una identidad mayor del 99%. En otra forma de realización, los análogos de los polipéptidos de la invención tendrán menos de aproximadamente 20 sustituciones, modificaciones o deleciones de residuos de aminoácidos, y más preferentemente menos de 10.

En otro ejemplo de la descripción, los polipéptidos tendrán una identidad mayor del 70%. En otro ejemplo, los polipéptidos tendrán una identidad mayor del 75%. En otra forma de realización de la invención, los polipéptidos tendrán una identidad mayor del 80%. En otra forma de realización, los polipéptidos tendrán una identidad mayor del 85%. En otra forma de realización, los polipéptidos tendrán una identidad mayor del 90%. En otra forma de realización, los polipéptidos tendrán una identidad mayor del 95%. En otra forma de realización, los polipéptidos tendrán una identidad mayor del 99%. En otra forma de realización, los derivados y análogos de polipéptidos de la invención tendrán menos de aproximadamente 20 sustituciones, modificaciones o deleciones de residuos de aminoácidos, y más preferentemente menos de 10. Las sustituciones preferidas son las conocidas en la técnica como conservadas, es decir los residuos sustituidos comparte propiedades físicas o químicas tales como hidrofobicidad, tamaño, carga o grupos funcionales.

Estas sustituciones son aquéllas que tienen una influencia mínima sobre la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido. Las sustituciones preferidas son las conocidas en la técnica como conservadas, es decir, los residuos sustituidos comparten propiedades físicas o químicas, tales como hidrofobicidad, tamaño, carga o grupos funcionales. Estas incluyen sustituciones tales como las descritas por Dayhoff, M. en Atlas of Protein Sequence and Structure 5, 1978 y por Argos, P. in EMBO J. 8, 779-785, 1989. Por ejemplo, los aminoácidos, bien naturales o no naturales, pertenecientes a uno de los grupos siguientes representan cambios conservadores:

ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr, val;

cys, ser, tyr, thr;

val, ile, leu, met, ala, phe;

lys, arg, orn, his;

y phe, tyr, trp, his.

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

En un enfoque alternativo, los análogos podrían ser proteínas de fusión, que incorporan fracciones que hacen que la purificación sea más fácil mediante, por ejemplo, marcaje del polipéptido deseado. Puede ser necesario eliminar la "marca" o puede ser el caso de que el polipéptido de fusión conserve la suficiente antigenicidad para ser útil.

El porcentaje de homología se define como la suma del porcentaje de identidad más el porcentaje de similitud o conservación del tipo de aminoácido.

En un ejemplo de la revelación, los análogos de polipéptidos de la invención tendrán una homología de aproximadamente un 70% con las secuencias ilustradas en las figuras o fragmentos de las mismas. En otra forma de realización de la invención, los polipéptidos tendrán una homología mayor del 80%. En otra forma de realización, los polipéptidos tendrán una homología mayor del 85%. En otra forma de realización, los polipéptidos tendrán una homología mayor del 90%. En otra forma de realización, los polipéptidos tendrán una homología mayor del 95%. En otra forma de realización, los polipéptidos tendrán una homología mayor del 99%. En otra forma de realización, los análogos de los polipéptidos de la invención tendrán menos de aproximadamente 20 sustituciones, modificaciones o deleciones de residuos de aminoácidos, y más preferentemente menos de 10.

Se puede usar un programa tal como el programa CLUSTAL para comparar secuencias de aminoácidos. Este programa compara las secuencias de aminoácidos y encuentra la alineación óptima mediante la inserción de espacios en cualquier secuencia que sea adecuada. Es posible calcular la identidad u homología de aminoácidos para una alineación óptima. Un programa como BLASTx alineará la parte más larga de secuencias similares y asignará un valor al ajuste. Por tanto, es posible obtener una comparación en la que se encuentran varias regiones de similitud, cada una con una puntuación diferente. Ambos tipos de análisis de identidad se contemplan en la presente invención.

Es bien sabido que es posible seleccionar un polipéptido antigénico para identificar regiones epitópicas, es decir las regiones que son responsables de la antigenicidad o inmunogenicidad del polipéptido. Los procedimientos para llevar a cabo tal detección selectiva son bien conocidos en la técnica. Por tanto, los fragmentos de la presente invención deberían incluir una o más de tales regiones epitópicas o ser suficientemente similares a tales regiones para conservar sus propiedades antigénicas/inmunogénicas.

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

Por tanto, lo que es para los análogos, derivados y fragmentos, es que poseen al menos un grado de la antigenicidad/inmunogenicidad de la proteína o polipéptido del que derivan.

También se incluyen polipéptidos en los que se han condensado otros compuestos que alteran las propiedades biológicas o farmacológicas de los polipéptidos, es decir polietilenglicol (PEG) para incrementar su semivida; secuencias de aminoácidos líder o secretoras para facilidad de purificación; secuencias prepro y pro; y (poli)sacáridos.

Además, en las situaciones en las que se encuentra que las regiones aminoacídicas son polimórficas, puede ser deseable variar uno o más aminoácidos concretos para simular con más eficacia los diferentes epítomos de las diferentes cepas de *Moraxella*.

Además, los polipéptidos de la presente invención se pueden modificar mediante acilación del NH₂ terminal (p. ej., mediante acetilación, amidación de ácido tioglicólico, amidación carboxi terminal, por ejemplo con amoniaco o metilamina) para proporcionar estabilidad, mayor hidrofobicidad para la unión o unión a un soporte o a otra molécula.

También se contemplan multímeros de hetero y homopolipéptidos de los fragmentos y análogos polipeptídicos. Estas formas poliméricas incluyen, por ejemplo, uno o más polipéptidos que se han reticulado con reticuladores tal como avidina/biotina, glutaraldehído o dimetilsuperimidato. Dichas formas poliméricas también incluyen polipéptidos que contienen dos o más secuencias contiguas en tándem o invertidas, producidas a partir de ARN multicistrónicos generados mediante tecnología de ADN recombinante.

En otra forma de realización, la presente invención también se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden uno o más polipéptidos o fragmentos o análogos de los mismos como se define en las figuras de la presente solicitud, y como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En otra forma de realización, la presente invención también se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden dos o más polipéptidos que tienen una secuencia escogida de la SEC ID N°: 2 o fragmentos o análogos de la misma; siempre que los polipéptidos estén unidos de modo que formen un polipéptido quimérico.

En otra forma de realización, la presente invención también se refiere a polipéptidos quiméricos que comprenden dos o más polipéptidos que comprenden una secuencia escogida de la SEC ID N°: 2, siempre que los polipéptidos estén unidos de modo que formen un polipéptido quimérico.

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

Con el fin de conseguir la formación de polímeros antigénicos (es decir, multímeros sintéticos), se pueden utilizar los polipéptidos que posean grupos bishaloacetilo, nitroarilhaluros, o similares, en los que los reactivos son específicos para los grupos tio. Por tanto, el enlace entre dos grupos mercapto de los diferentes polipéptidos puede ser un enlace sencillo o puede estar compuesto por un grupo de unión de al menos dos, normalmente al menos cuatro, y no más de 16, pero habitualmente no más de aproximadamente 14 átomos de carbono.

En formas de realización concretas, como se define en las reivindicaciones adjuntas, fragmentos y análogos polipeptídicos de la invención no contienen un residuo inicial de metionina (Met). Preferentemente, los polipéptidos no incorporarán una secuencia líder o secretora (secuencia señal). La porción de señal de un polipéptido de la invención puede determinarse de acuerdo con técnicas de biología molecular establecidas. En general, el polipéptido de interés se puede aislar de un cultivo de *Moraxella* y secuenciarse posteriormente para determinar el residuo inicial de la proteína madura y, por tanto, la secuencia del polipéptido maduro.

En otra forma de realización como se define en las reivindicaciones adjuntas, los polipéptidos de la invención pueden carecer de un péptido líder en el extremo N y/o un dominio transmembrana y/o bucles y/o giros externos.

La presente invención además proporciona un fragmento del polipéptido que comprende sustancialmente todos los dominios celulares extraordinarios de un polipéptido que tiene una identidad de al menos un 80%, más preferentemente una identidad del 95%, a un segundo polipéptido que comprende una secuencia escogida de SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos del mismo, sobre toda la longitud de dicha secuencia.

Cabe entender que los polipéptidos se pueden producir y/o usar sin su codón inicial (metionina o valina) y/o sin su péptido líder para favorecer la producción y purificación de polipéptidos recombinantes. Se sabe que clonar genes sin secuencias que codifiquen péptidos líder restringirá los polipéptidos al citoplasma de *E. coli* y facilitará su recuperación (Glick, B.R. y Pasternak, J.J. (1998) Manipulation of gene expression in prokaryotes. En "Molecular biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA", 2ª edición, ASM Press, Washington DC, pág. 109-143).

De acuerdo con otro aspecto de la invención, también se proporciona, como se define en las reivindicaciones adjuntas (i) una composición de materia que contiene un polipéptido de la invención, junto con un portador, diluyente o adyuvante; (ii) una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención y un portador, diluyente o adyuvante; (iii) una vacuna que comprende un polipéptido de la invención y un portador, diluyente o adyuvante. En la presente memoria descriptiva también se describe (iv) un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra *Moraxella* en un huésped, mediante la administración al huésped de una cantidad inmunogénicamente eficaz de un polipéptido de la invención para provocar una respuesta inmunitaria, por ejemplo una respuesta inmunitaria protectora a *Moraxella*; (v) un procedimiento para prevenir y/o tratar una infección producida por *Moraxella*; mediante la administración a un huésped que lo necesite de una cantidad profiláctica o terapéutica de un polipéptido de la invención; y (vi) un procedimiento para prevenir y/o tratar una infección producida por *Moraxella*; mediante la administración a un huésped que lo necesite de una cantidad profiláctica o terapéutica de un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de la invención.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, también se proporciona, como se define en las reivindicaciones adjuntas, (i) una composición de materia que contiene un polinucleótido de la invención, junto con un portador, diluyente o adyuvante; (ii) una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido de la invención y un portador, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. En la presente memoria descriptiva también se describe (iii) un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria contra *Moraxella* en un huésped, mediante la administración al huésped de una cantidad inmunogénicamente eficaz de un polinucleótido de la invención para provocar una respuesta inmunitaria, por ejemplo una respuesta inmunitaria protectora a *Moraxella*; y, particularmente, (iv) un pro-

cedimiento para prevenir y/o tratar una infección producida por *Moraxella*; mediante la administración a un huésped que lo necesite de una cantidad profiláctica o terapéutica de un polinucleótido de la invención a un huésped que lo necesite.

- 5 La invención también proporciona, en otro aspecto, el uso de una composición vacunal o composición farmacéutica de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico de una infección producida por *Moraxella*.

10 Antes de la inmunización, los polipéptidos de la invención también se pueden acoplar o conjugar a proteínas portadores, tales como la toxina del tétanos la toxina diftérica, el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, el antígeno VP1 del virus de la poliomielitis o cualquier otra toxina o antígeno vírico o bacteriano o cualquier proteína adecuada para estimular el desarrollo de una respuesta inmunitaria más fuerte. Este acoplamiento o conjugación se puede realizar química o genéticamente. Una descripción más detallada de la conjugación péptido-portador está disponible en Van Regenmortel, M.H.V., Briand J.P., Muller S., Plaué S., "Synthetic Polypeptides as antigens" en Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 19 (ed.) Burdou, R.H. & Van Knippenberg P.H. (1988), Elsevier New York.

De acuerdo con otro aspecto se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más polipéptidos de *Moraxella* de la invención en una mezcla con un adyuvante farmacéuticamente aceptable. Entre los adyuvantes adecuados se incluyen (1) formulaciones de emulsión de aceite en agua tales como MP59TM, SAFTM, RibiTM; (2) adyuvante completo o incompleto de Freund; (3) sales, es decir $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2$, $\text{Al}(\text{OH})_3$, AlPO_4 , sílice, caolín; (4) derivados de saponina tales como StimulonTM o partículas generadas a partir del mismo, tales como ISCOM (complejos inmunoestimuladores); (5) citocinas tales como interleucinas, interferones, factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF); (6) otras sustancias, tales como polinucleótidos de carbono, es decir poli IC y poli AU, toxina del cólera destoxificada (CTB) y toxina termolábil de *E. coli* para la inducción de de inmunidad mucosa; (7) liposomas. Una descripción más detallada de los adyuvantes está disponible en una revisión de M.Z., I Khan y col. en Pharmaceutical Research, vol. 11, N° 1 (1994) pág. 2-11, así como en otra revisión realizada por Gupta y col., en Vaccine, Vol. 13, N° 14, pág. 1263-1276 (1995) y el en documento WO 99/24578. Entre los adyuvantes preferidos se incluyen QuilATM, QS21TM, AlhydrogelTM y AdjuvaphosTM.

30 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar por vía parenteral mediante inyección, infusión rápida, absorción nasofaríngea, dermoabsorción, o bucal u oral.

35 Con el término "composición farmacéutica" también se quiere incluir anticuerpos. De acuerdo con la presente invención, también se proporciona el uso de uno o más anticuerpos que tienen especificidad de unión para los polipéptidos de la presente invención para el tratamiento o profilaxis de la infección producida por *Moraxella* y/o enfermedades y síntomas mediados por la infección producida por *Moraxella*.

40 Las composiciones farmacéuticas de la invención se usan para la profilaxis de la infección producida por *Moraxella* y/o enfermedades y síntomas mediados por la infección producida por *Moraxella*, como se describe en Manual of Clinical Microbiology, P.R. Murray (Editor en jefe), E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover y R.H. Tenover. ASM Press, Washington, D.C. séptima edición, 1999, pág. 1773.

45 En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se usan para el tratamiento o profilaxis de otitis media, sinusitis, tos persistente, laringitis aguda, queratitis supurante, conjuntivitis del neonato. En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se usan para el tratamiento o profilaxis de la infección y/o enfermedades y síntomas mediados por *Moraxella*. En otra forma de realización, la infección está causada por *Moraxella Catarrhalis*.

50 En una forma de realización concreta, las composiciones farmacéuticas se administran a los huéspedes en riesgo de sufrir infección por *Moraxella*, tales como lactantes, ancianos y huéspedes inmunocomprometidos.

55 Como se usa en la presente solicitud, el término "huésped" incluye mamíferos. En otra forma de realización, el mamífero es humano.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas están en forma de monodosis de aproximadamente 0,001 a 100 $\mu\text{g/kg}$ (antígeno/peso corporal) y, más preferentemente, de 0,01 a 10 $\mu\text{g/kg}$ y más preferentemente de 0,1 a 1 $\mu\text{g/kg}$ de 1 a 3 veces, con un intervalo de intervalos de aproximadamente 1 a 6 semanas entre inmunizaciones.

60 Preferentemente, las composiciones farmacéuticas están en forma de monodosis de aproximadamente 0,1 μg a 10 mg y, más preferentemente, de 1 μg a 1 mg y más preferentemente de 10 a 10' μg de 1 a 3 veces, con un intervalo de intervalos de aproximadamente 1 a 6 semanas entre inmunizaciones.

65 De acuerdo con otro aspecto, se proporcionan polinucleótidos que codifican polipéptidos que se caracterizan por la secuencia de aminoácidos que comprende la SEC ID N°: 2 o fragmentos o análogos de la misma, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

ES 2 316 627 T3

En una forma de realización, los polinucleótidos son los que se ilustran en la SEC ID N°: 1, que puede incluir los marcos de lectura abiertos (ORF), que codifican los polipéptidos de la invención, y son como se define en las reivindicaciones adjuntas,

Se apreciará que las secuencias polinucleotídicas ilustradas en las figuras se pueden alterar con codones degenerados, aunque siguen codificando los polipéptidos de la invención. En consecuencia, la presente invención proporciona además polinucleótidos que hibridan con las secuencias polinucleotídicas descritas en la presente memoria descriptiva en lo que antecede (o las secuencias complementarias de las mismas), que tiene una identidad de al menos un 80% entre secuencias y como se define en las reivindicaciones adjuntas. En una forma de realización, una identidad entre secuencias de al menos el 85%. En una forma de realización, una identidad entre secuencias de al menos el 90%. En otra forma de realización, los polinucleótidos son hibridables en condiciones estrictas, es decir con una identidad de al menos un 95%. En otra forma de realización, una identidad de más del 97%.

Un experto en la técnica puede determinar con facilidad las condiciones estrictas adecuadas para la hibridación (véase, por ejemplo, Sambrook y col., (1989) Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology, (1999) Editado por Ausubel F.M. y col., John Wiley & Sons, Inc., N.Y.).

En otra forma de realización, la presente invención proporciona en la medida en que dentro de las reivindicaciones adjuntas se abarcan polinucleótidos aislados que hibridan en condiciones estrictas con

- (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o
- (b) la complementaria de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido;

en el que dicho polipéptido comprende una secuencia escogida de la SEC ID N°: 2, 4 o fragmentos o análogos de las mismas.

En la presente memoria descriptiva también se describen polinucleótidos aislados que hibridan en condiciones estrictas con

- (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o
- (b) la complementaria de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido;

en el que dicho polipéptido comprende al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N° 2, 4 o fragmentos o análogos de las mismas.

En la presente memoria descriptiva también se describen polinucleótidos aislados que hibridan en condiciones estrictas con

- (a) una secuencia de ADN que codifica un polipéptido o
- (b) la complementaria de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido;

en el que dicho polipéptido comprende al menos 10 residuos de aminoácidos contiguos de un polipéptido que comprende una secuencia escogida de las SEC ID N°: 2 o 4.

En otra forma de realización, los polinucleótidos son los que codifican polipéptidos de la invención ilustrados en la SEC ID N°: 2.

En otra forma de realización, los polinucleótidos son los que se ilustran en la SEC ID N°: 1 que codifica polipéptidos de la invención.

Como un experto en la técnica apreciará con facilidad, los polinucleótidos incluyen tanto ADN como ARN.

La presente invención también incluye polinucleótidos complementarios a los polinucleótidos descritos en la presente solicitud.

De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un procedimiento para producir polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes a través de la expresión de un polinucleótido que codifica dicho polipéptido en una célula huésped y la recuperación del producto polipeptídico expresado. Como alternativa, los polipéptidos se pueden producir de acuerdo con técnicas químicas sintéticas establecidas, es decir síntesis en fase de solución o de fase sólida de oligopéptidos que se ligan para producir el polipéptido completo (ligación en bloque).

En las referencias siguientes se describen procedimientos generales para la obtención y la evaluación de polinucleótidos y polipéptidos: Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Editado por Ausubel F.M. y col., John Wiley and Sons, Inc. New York; *PCR Cloning Protocols, from Molecular Cloning to Genetic Engineering*, Editado por White B.A., Humana Press, Totowa, New Jersey, 1997, 490 páginas; *Protein Purification, Principles and Practices*, Scopes R.K., Springer-Verlag, New York, 3ª Edición, 1993, 380 páginas; *Current Protocols in Immunology*, Editado por Coligan J.E. y col., John Wiley & Sons Inc., New York.

La presente invención proporciona células huésped transfeccionadas con vectores que comprenden los polinucleótidos de la invención.

La presente invención proporciona un procedimiento para producir un polipéptido que comprende cultivar una célula huésped de la invención en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido.

Para la producción recombinante, las células huésped se transfeccionan con vectores que codifican los polipéptidos de la invención y, después, se cultivan en un medio nutritivo modificado según sea adecuado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes. Vectores adecuados son aquellos que son viables y replicables en el huésped escogido e incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, por ejemplo plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos. La secuencia polipeptídica puede estar incorporada en el vector en el lugar adecuado usando enzimas de restricción de modo que esté unida de forma operable a una región de control de la expresión que comprende un promotor, un lugar de unión al ribosoma (región consenso o secuencia de Shine-Dalgarno) y, opcionalmente, un operador (elemento de control). Se pueden seleccionar componentes individuales de la región de control de la expresión que sean adecuados para un huésped y un vector dados de acuerdo con los principios de biología molecular establecidos (Sambrook y col, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Editado por Ausubel F.M. y col., John Wiley & Sons, Inc., N.Y.). Entre los promotores adecuados se incluyen el promotor de LTR o SV40, promotores lac, tac o trp de *E. coli* y el promotor PL del fago lambda. Preferentemente, los vectores incorporarán un origen de replicación, así como marcadores de selección, es decir un gen de resistencia a ampicilina. Entre los vectores bacterianos se incluyen pET, pQE70, pQE60, pQE-9, pD10 phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5, y los vectores eucarióticos pBlueBacIII, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG, pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL. Las células huésped pueden ser bacterianas, es decir *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*; fúngicas, es decir *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulins*; de levaduras, es decir *Saccharomyces* o eucarióticas, es decir CHO, COS.

Tras la expresión del polipéptido en cultivo, las células se cosechan normalmente mediante centrifugación, después se rompen por medios físicos o químicos (si el polipéptido expresado no se secreta al medio) y el extracto bruto resultante se conserva para aislar el polipéptido de interés. La purificación del polipéptido del medio de cultivo o del lisado se puede conseguir mediante técnicas establecidas dependiendo de las propiedades del polipéptido, es decir usando sulfato amónico o precipitación con etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lectina. La purificación final se puede conseguir usando HPLC.

Los polipéptidos se pueden expresar con o sin una secuencia líder o de secreción. En el primer caso, el líder se puede eliminar usando procesamiento postraduccional (véanse los documentos US 4.431.739; US 4.425.437; y US 4.338.397) o se puede eliminar químicamente después de purificar el polipéptido expresado.

Como también se describe en la presente memoria descriptiva, los polipéptidos de *Moraxella* de la invención se pueden usar en una prueba diagnóstica para la infección producida por *Moraxella*, en particular la infección producida por *Moraxella*.

Son posibles varios procedimientos diagnósticos para la infección producida por *Moraxella* en un huésped susceptible a la infección producida por *Moraxella*, por ejemplo la detección del organismo *Moraxella* en una muestra biológica, se puede seguir el procedimiento siguiente:

- a) obtención de una muestra biológica de un huésped:
 - b) incubar un anticuerpo o fragmento del mismo reactivo con un polipéptido de *Moraxella* de la invención con la muestra biológica para formar una mezcla; y
- detectar anticuerpo específicamente unido o fragmento unido en la mezcla que indique la presencia de *Moraxella*.

Como alternativa, un procedimiento para el diagnóstico de la infección por *Moraxella* en un huésped susceptible a la infección producida por *Moraxella* incluye un procedimiento para la detección de anticuerpos específicos de un antígeno de *Moraxella* en una muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene dicho anticuerpo se puede realizar del siguiente modo:

- a) obtención de una muestra biológica de un huésped;
- b) incubar uno o más polipéptidos de *Moraxella* de la invención o fragmentos de los mismos con la muestra biológica para formar una mezcla; y
- c) detectar antígeno específicamente unido o fragmento unido en la mezcla que indique la presencia de anticuerpos específicos de *Moraxella*.

Un experto en la técnica reconocerá que esta prueba diagnóstica puede tomar varias formas, incluida una prueba inmunológica tal como un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo o un ensayo de aglutinación con látex, esencialmente para destinar si hay anticuerpos específicos del polipéptido presentes en un organismo.

Las secuencias de ADN que codifican polipéptidos de la invención también se pueden usar para diseñar sondas de ADN para usar en la detección de la presencia de *Moraxella* en una muestra biológica de la que se sospecha que contiene tal bacteria. El procedimiento de detección descrito en la presente memoria descriptiva comprende:

- a) obtener la muestra biológica de un huésped;
- b) incubar uno o más sondas de ADN que tienen una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la invención o fragmento del mismo con la muestra biológica para formar una mezcla; y
- c) detectar sonda de ADN específicamente unida en la mezcla, que indica la presencia de la bacteria *Moraxella*.

Las sondas de ADN de esta invención también se pueden usar para detectar *Moraxella* circulante, es decir ácidos nucleicos de *Moraxella* en una muestra, por ejemplo usando una reacción en cadena de la polimerasa, como procedimiento diagnóstico de infecciones producidas por *Moraxella*. La sonda se puede sintetizar usando técnicas convencionales y se puede inmovilizar en una fase sólida, o puede marcarse con un marcador detectable. Una sonda de ADN preferida para esta aplicación es un oligómero que tiene una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 6 nucleótidos contiguos de los polipéptidos de *Moraxella* de la invención. En otro ejemplo, la sonda de ADN preferida será un oligómero que tiene una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos de los polipéptidos de *Moraxella* de la invención. En otro ejemplo, la sonda de ADN preferida será un oligómero que tiene una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 30 nucleótidos contiguos de los polipéptidos de *Moraxella* de la invención. En otro ejemplo, la sonda de ADN preferida será un oligómero que tiene una secuencia complementaria a al menos aproximadamente 50 nucleótidos contiguos de los polipéptidos de *Moraxella* de la invención.

Otro procedimiento diagnóstico para la detección de *Moraxella* en un huésped comprende:

- a) marcar un anticuerpo reactivo con un polipéptido de la invención o fragmento del mismo con un marcador detectable;
- b) administrar al huésped el anticuerpo marcado o fragmento marcado; y
- c) detectar anticuerpo específicamente unido o fragmento marcado en el huésped que indica la presencia de *Moraxella*.

En otra forma de realización, en un procedimiento de inmunización con ADN se pueden usar polinucleótidos que codifican polipéptidos de la invención, o fragmentos, análogos o derivados de los mismos. Es decir, se pueden incorporar en un vector que es replicable y expresable tras la inyección en el mismo, produciendo el polipéptido antigénico *in vivo*. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden incorporarse en un vector plasmídico bajo el control del promotor de CMV, que es funcional en células eucarióticas. Preferentemente, el vector se inyecta por vía intramuscular.

Otro aspecto de la invención es el uso de los polipéptidos de *Moraxella* de la invención como inmunógenos para la producción de anticuerpos específicos para el diagnóstico y, en particular, el tratamiento de la infección producida por *Moraxella*.

Otro aspecto de la invención es el uso de los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la invención para la inmunización pasiva. Se podrían usar los anticuerpos descritos en la presente solicitud. Los anticuerpos adecuados se pueden determinar usando procedimientos de detección selectiva adecuados mediante, por ejemplo, medición de la capacidad de un anticuerpo concreto para proteger de forma pasiva contra la infección producida por *Moraxella* en un modelo de prueba. Un ejemplo de un modelo animal es el modelo de ratones descrito en los ejemplos de la presente memoria descriptiva. El anticuerpo puede ser un anticuerpo entero o un fragmento del mismo de unión al antígeno, y puede pertenecer a cualquier clase de inmunoglobulina. El anticuerpo o fragmento puede ser de origen

animal, específicamente de origen mamífero, y, más específicamente, de origen murino, de rata o ser humano. Puede ser un anticuerpo natural o un fragmento del mismo, o, si se desea, un anticuerpo recombinante o un fragmento de anticuerpo. El término anticuerpo recombinante o fragmento de anticuerpo quiere decir anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se ha producido usando técnicas de biología molecular. El anticuerpo o los fragmentos de anticuerpo pueden ser policlonales, o, preferentemente, monoclonales. Puede ser específico para un número de epítomos asociados con los polipéptidos de *Moraxella*, pero es, preferentemente, específico para uno.

El uso de un polinucleótido de la invención en la inmunización genética emplearán, preferentemente, un procedimiento o sistema de liberación adecuado, tal como inyección directa de ADN plasmídico en los músculos [Wolf y col. H M G (1992) 1: 363; Turnes y col., Vaccine (1999), 17: 2089; Le y col., Vaccine (2000) 18: 1893; Alves y col., Vaccine (2001) 19: 788], inyección de ADN plasmídico con o sin adyuvantes [Ulmer y col., Vaccine (1999) 18: 18; MacLaughlin y col., J. Control Release (1998) 56: 259; Hartikka y col., Gene Ther. (2000) 7: 1171 82; Benvenisty y Reshef, PNAS USA (1986) 83:9551; Singh y col., PNAS USA (2000) 97: 811], dirigido a las células mediante la liberación de ADN en complejo con portadores específicos [Wa y col., J Biol Chem (1989) 264: 16985; Chaplin y col., Infect. Immun. (1999) 67: 6434], inyección de plásmido en complejo o encapsulado en diversas formas de liposomas [Ishii y col., AIDS Research and Human Retroviruses (1997) 13: 142; Perrie y col., Vaccine (2001) 19: 3301], administración de ADN con diferentes procedimientos de bombardeo [Tang y col., Nature (1992) 356: 152; Bisenbraun y col., DNA Cell Biol (1993) 12: 791; Chen y col., Vaccine (2001) 19: 2908], y administración de ADN con vectores vivos [Tubulekas y col., Gene (1997) 190: 191; Pushko y col., Virology (1997) 239: 389; Spreng y col. FEMS (2000) 27: 299; Dietrich y col., Vaccine (2001) 19: 2506].

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de la infección producida por *Moraxella* en un huésped susceptible a la infección producida por *Moraxella*, que comprende administrar al huésped una cantidad profiláctica o terapéutica de una composición farmacéutica de la invención.

En otra forma de realización, la invención proporciona el uso de una composición farmacéutica de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de la infección producida por *Moraxella*.

En otra forma de realización, la invención proporciona un kit que comprende un polipéptido de la invención para la detección o el diagnóstico de la infección producida por *Moraxella*.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente. En caso de conflicto, la presente especificación, incluidas las definiciones, tendrá prioridad. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no están destinados a ser limitantes.

Se entiende que esta invención se refiere a la SEC ID N°: 1 y la SEC ID N°: 2. No obstante, en los siguientes ejemplos se observan referencias a otras SEC ID N°: S para ayudar a entender la invención.

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra la clonación y las características moleculares del gen SHB-MC100 y el correspondiente polipéptido. La región codificadora del gen SHB-MC100 de *M. catarrhalis* (SEC ID N°: 1) se amplificó mediante PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer, San Jose, CA) del ADN genómico de la cepa ET-SU C-2 de *M. catarrhalis* usando los siguientes oligos que contenían extensiones de bases para la adición de sitios de restricción *NdeI* (CATATG) y *NotI* (GCGGCCGC): DMAR529 (5'-GGGACTTCCATATGCAGTCGCGCAGAA CATCAGCCG -3') y DMAR530 (5'-ATTATATAGCGGCCGCAAGCCAATGCGTGCCATTTC-3'). Los productos de la PCR se purificaron del gel de azarosa usando un kit de extracción en gel QIAquick siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Chatsworth, CA) y se digirieron con *NdeI* y *NotI* (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Baie d'Urfé, Canadá). El vector pET21b(+) Novagen, Madison WI) se digirió con *NdeI* y *NotI* y se purificó en gel de azarosa usando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen). Los productos de la PCR *NdeI-NotI* se ligaron al vector de expresión pET21b(+) con *NdeI-NotI*. Los productos ligados se transformaron en la cepa de *E. coli* DH5α [*φsodlacZΔM15 Δ (lacZYA-argF)*_U169 endA1 recA1 *hsdR17* (r_K-m_K+) *deoR thi-1 supE44 λ- gyrA96 relA1*] (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) de acuerdo con el procedimiento de of Simanis (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed) pág. 109-135). El plásmido recombinante pET21b(+) (rpET21b(+)) que contenía en gel SHB-MC100 se purificó usando un kit de Qiagen y se secuenció el inserto de ADN Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit, ABI, Foster City, CA).

ES 2 316 627 T3

TABLA 1

Cebadores oligonucleotídicos usados para la amplificación por PCR de los genes de M. catarrhalis

Genes	ID de los cebadores	. Sitio de restricción	Vector	Secuencia	SEC ID N°
SHB-MC100	DMAR529	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'- GGGACTTCCATAT GCAGTCGCAGAAC ATCAGCCG-3'	5
SHB-MC100	DMAR530	<i>NotI</i>	pET21b (+)	5'- ATTATATAGCGGC CGCAAGCCAATGC GTGCCATTTC-3	6
SHB-MC100	RIOS199	<i>BglII</i>	pCMV-GH	5'- GGCAGATCTTGCA GTCGCAGAACATC AGCCG-3	7
SHB-MC100	RIOS200	<i>Sall</i>	pCMV-GH	5'- ACGCGTCGACTTA AAGCCAATGCGTG CCATTTC-3	8
SHB-MC101	DMAR614	<i>NdeI</i>	pET21b (+)	5'- CATTTAGTATCCA TATGTGTAGCGGT CAAAACGAACAA- 3'	9
SHB-	DMAR615	<i>XhoI</i>	pET21b	5'-	10

MC101			(+)	CAATCTTATCTCG AGTTCAATATTAG TTGGCATACTGC- 3'	
SHB- MC101	RIOS197	<i>BamHI</i>	pCMV- GH	5'- CTAGGATCCTTGT AGCGGTCAAAACG AACAA-3'	11
SHB- MC101	RIOS198	<i>HindIII</i>	pCMV- GH	5'- CAGAAGCTTTTAT TCAATATTAGTTG GCATACCTGC-3'	12

Se determinó que el marco de lectura abierto (ORF) que codifica el polipéptido SHB-MC100 contiene 549 pb y codifica un polipéptido de 182 residuos de aminoácidos con un pI predicho de 1199 y una masa molecular predicha de 20828,17 Da. El análisis de la secuencia de residuos de aminoácidos predicha (SEC ID N° 2) usando el software Spsscan (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) sugirió la existencia de un péptido señal de 15 residuos de aminoácidos (VVLGLALLLVHPNLQ), que termina con un sitio de escisión localizado entre dos residuos de glutamina.

Para confirmar la presencia del gen SHB-MC100 (SEC ID N°:1) mediante amplificación por PCR se usaron 3 cepas distintas de *M. catarrhalis*: East Tennessee State University proporcionó los aislamientos clínicos ETSU C-2, ETSU T-25 y ETSU 658 de *M. catarrhalis*. En estos experimentos se usó XL1-Blue MRF' de *E. coli* como control negativo. El gen SHB-MC100 (SEC ID N°: 1) se amplificó mediante PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer) del ADN genómico de las 3 cepas de *M. catarrhalis* y la cepa control de *E. coli* usando los cebadores oligonucleotídicos DMAR529 y DMAR530 (Tabla 1). La PCR se realizó con 5 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 47°C y 90 s a 72°C, seguido por 30 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 60°C y 90 s a 72°C y un periodo de elongación final de 7 min a 72°C. Los productos de la PCR se fraccionaron por tamaño en geles de agarosa al 1% y se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio. Los resultados de estas amplificaciones por PCR se presentan en la Tabla 2. El análisis de los productos de amplificación reveló que el gen SHB-MC100 (SEC ID N°:1) estaba presente en el genoma de las 3 cepas de *M. catarrhalis* analizadas. No se detectó este producto cuando el ADN de *E. coli* control se sometió a amplificaciones idénticas por PCR con estos cebadores oligonucleotídicos.

TABLA 2

Identificación de genes de M. catarrhalis mediante amplificación por PCR

Identificación de la cepa	Identificación mediante amplificación por PCR de	
	SHB-MC100	SHB-MC101
ETSU C-2	+	+
ETSU 658	+	+
ETSU T-25	+	+
<u>E. coli</u>	-	-

Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra la clonación y las características moleculares del gen SHB-MC101 y el correspondiente polipéptido.

La región codificadora del gen SHB-MC101 de *M. catarrhalis* (SEC ID N°: 3) se amplificó mediante PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer) del ADN genómico de la cepa ETSU C-2 de *M. catarrhalis* usando los siguientes oligos que contenían extensiones de bases para la adición de sitios de restricción *Nde*I (CATATG) y *Xho*I (CTCGAG): DMAR614 y DMAR615, que se presentan en la Tabla 1. Los procedimientos usados para clonar el gen SHB-MC101 en un vector de expresión y secuenciar son similares a los procedimientos descritos en el Ejemplo 1.

Se determinó que el marco de lectura abierto (ORF) que codifica el polipéptido SHB-MC101 contiene 798 pb y codifica un polipéptido de 265 residuos de aminoácidos con un pl predicho de 4,48 y una masa molecular predicha de 28600,89 Da. El análisis de la secuencia de residuos de aminoácidos predicha (SEC ID N° 4) usando el software Spsscan (Wisconsin Sequence Analysis Package; Genetics Computer Group) sugirió la existencia de un péptido señal de 20 residuos de aminoácidos (VKFKTFGLMAAIVGTFSISA), que termina con un sitio de escisión localizado entre un residuo de alanina y un residuo de cisteína.

Se mostró que el gen SHB-MC101 estaba presente tras amplificación por PCR usando los cebadores oligonucleotídicos DMAR614 y DMAR615 en las 3 cepas de *M. catarrhalis* analizadas (Tabla 2). Los procedimientos usados para la amplificación por PCR del gen SHB-MC101 fueron similares a los procedimientos presentados en el Ejemplo 1. No se detectó este producto cuando el ADN de *E. coli* control se sometió a amplificaciones idénticas por PCR con estos cebadores oligonucleotídicos.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la clonación de genes de *M. catarrhalis* en el plásmido de CMV pCMV-GH.

Las regiones de ADN codificadoras de polipéptidos de *M. catarrhalis* se insertaron en fase en dirección 5' de un gen de la hormona de crecimiento humana (Hg.) que estaba bajo el control transcripcional del promotor de citomegalovirus (CMV) en el vector plasmídico pCMV-GH (Tang y col., Nature, 1992, 356:152). El promotor de CMV es un plásmido no funcional en las células de *E. coli*, pero activo tras la administración del plásmido en células eucarióticas. El vector también incorporó el gen de resistencia a ampicilina.

Las regiones codificadoras de los genes SHB-MC100 (SEC ID N°: 1) y SHB-MC101 (SEC ID N°: 3) sin sus regiones de péptido líder se amplificaron mediante PCR (DNA Thermal Cycler GeneAmp PCR system 2400 Perkin Elmer) del ADN genómico de la cepa ETSU C-2 de *M. catarrhalis* usando cebadores oligonucleotídicos que contenían extensiones de bases para la adición de sitios de restricción *Bam*HI (GGATCC), *Bgl*II (AGATCT), *Sal*I (GTCGAC), o *Hind*III (AAGCTT), que se describen en la Tabla 1. Los productos de la PCR se purificaron del gel de azarosa usando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen), y se digirieron con enzimas de restricción (Amersham Pharmacia Biotech, Inc). El vector pCMV-GH (Laboratorio del Dr. Stephen A. Johnston, Departamento de Bioquímica, The University of Texas, Dallas, Texas) se digirió con *Bam*HI, *Bgl*II, *Sal*I, o *Hind*III y se purificó del gel de azarosa usando un kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen). Los fragmentos de ADN digeridos se ligaron en el vector pCMV-GH digerido para crear los polipéptidos de fusión hGH-SHB-MC100 y hGH-SHB-MC101 bajo el control del promotor de CMV. Los productos ligados se transformaron en la cepa de *E. coli* DH5 [*φ*sodlacZΔM15 Δ (*lac*ZYA-argF)_{U169} endA1 recA1 *hsd*R17_{(r_K-m_K+) deoR thi-1 supE44 λ-gyrA96 relA1] (Gibco BRL) de acuerdo con el procedimiento de of Simanis (Hanahan, D. DNA Cloning, 1985, D.M. Glover (ed) pág. 109-135). Los plásmidos pCMV recombinantes se purificaron usando un kit de Qiagen y las secuencias nucleotídicas de los insertos de ADN se verificaron mediante secuenciación de ADN.}

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra el uso de ADN para provocar una respuesta inmunitaria a antígenos polipeptídicos de *M. catarrhalis*.

Un grupo de 8 ratones hembra BALB/c (Charles River, St-Constant, Québec, Canadá) se inmunizaron mediante inyección intramuscular de 100 µl tres veces a intervalos de dos o tres semanas con 50 µg de genes SHB-MC100 (SEC ID N° 1) y SHB-MC101 (SEC ID N°: 3) codificadores de GH-pCMV recombinante 1) y SHB-MC101 (SEC ID N°: 3). En presencia de 50 µg del plásmido que expresa el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) pCMV-GH-GM-CSF (Laboratorio del Dr. Stephen A. Johnston, Departamento de Bioquímica, The University of Texas, Dallas, Texas). Como control se inyectó a un grupo de ratones 50 µg de pCMV-GH en presencia de 50 µg de pCMV-GH-GM-CSF. Las muestras de sangre se recogieron del seno orbital antes de cada inmunización y siete días después de la tercera inyección. Las respuestas de anticuerpo en suero se determinaron mediante ELISA usando los correspondientes polipéptidos recombinantes de *M. catarrhalis* marcados con His-Tag como antígeno de recubrimiento. La producción y purificación de estos polipéptidos recombinantes de *M. catarrhalis* marcados con His-Tag se presentan en el Ejemplo 5.

ES 2 316 627 T3

Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra la producción y purificación de polipéptidos recombinantes de *M. catarrhalis*.

5 El plásmido pET21 recombinante con los genes SHB-MC100 (SEC ID N°: 1) y SHB-MC101 (SEC ID N°: 3) se usó para transformar mediante electroporación (Gene Pulser II apparatus, BIO-RAD Labs, Mississauga, Canadá) la cepa BL21 de *E. coli* (DE3) [F⁻ ompT hsdS_B(r⁻_Bm⁻_B) gal dcm (DE3)] (Novagen). En esta cepa de *E. coli*, el promotor T7 que controla la expresión del polipéptido recombinante es reconocido específicamente por la T7 ARN polimerasa (presente en el profago λ DE3) cuyo gen está bajo el control del promotor lac que es inducible por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). El transformante BL21(DE3)/rpET21 se cultivó a 37°C con agitación a 250 rpm en caldo LB (peptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l) que contiene 100 μ g de carbenicilina (Sigma-Aldrich Canadá Ltd., Oakville, Canadá) por ml hasta que la A₆₀₀ alcanzó un valor de 0,5. Con el fin de inducir la producción de los polipéptidos recombinantes marcados con His de *M. catarrhalis*, las células se incubaron durante 3 horas adicionales en presencia de IPTG a una concentración final de 1 mM. Las células inducidas de un cultivo de 15 500 ml se sedimentaron mediante centrifugación y se congelaron a -70°C.

La purificación del polipéptido recombinante de SHB-MC100 marcado con His de la fracción no soluble de BL21 inducido por IPTG (DE3)/rpET21b(+) se realizó mediante cromatografía de afinidad basada en las propiedades de la secuencia de His-Tag (6 residuos consecutivos de histidina) para unirse a cationes divalentes (Ni²⁺) inmovilizados sobre la resina de quelación de metales de His-Bind. Brevemente, las células sedimentadas obtenidas de un cultivo de 500 ml inducidas con IPTG se resuspendieron en tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 7,9) que contiene guanidina-HCl 6M, se sometieron a sonicación y se centrifugaron a 12.000 X g durante 20 min para eliminar los residuos. El sobrenadante se incubó con resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen) durante 45 minutos a 4°C. El polipéptido recombinante de SHB-MC100 marcado con His eluyó de la resina con una solución que contiene 25 guanidina-HCl 6M e imidazol 250 mM-NaCl 500 mM-Tris 20 mM, pH 7,9. La eliminación de la sal y el imidazol de las muestras se realizó mediante diálisis contra Tris 10 mM y 0,9% de NaCl, a pH 7,9 durante la noche a 4°C. La cantidad de polipéptido recombinante se estimó mediante microBCA (Pierce, Rockford, Illinois).

La purificación del polipéptido recombinante SHB-MC101 de la fracción citoplásmica soluble de BL21(DE3)/rpET21b (+) inducida con IPTG se realizó tal y como se ha descrito en lo que antecede usando los tampones sin guanidina-HCl.

Ejemplo 6

35 Este ejemplo ilustra la reactividad del polipéptido recombinante marcado con His de SHB-MC100 con anticuerpos presentes en anginas palatinas humanas y sueros recogidos de ratones tras inmunización con preparaciones antigénicas de *M. catarrhalis*.

40 Como se muestra en la Tabla 3, el polipéptido recombinante marcado con His SHB-MC100 se reconoció mediante inmunotransferencias a través de los anticuerpos presentes en las anginas palatinas humanas. Indica que los seres humanos, que normalmente están en contacto con *M. catarrhalis* si desarrollan anticuerpos que son específicos de este polipéptido. Estos anticuerpos humanos concretos podrían estar implicados en la protección contra la infección por *M. catarrhalis*. Además, las inmunotransferencias también revelaron que los sueros recogidos de los ratones inmunizados con los polipéptidos de membrana enriquecidos con la preparación antigénica de *M. catarrhalis* que indujeron un significativo aclaramiento pulmonar en un modelo de ratón también desarrollaron anticuerpos que reconocieron este polipéptido. Estos resultados indican que este polipéptido estaba presente en la preparación antigénica de *M. catarrhalis* que protegía a los ratones frente a la infección y que inducía anticuerpos que reaccionaban con el correspondiente polipéptido recombinante marcado con His de SHB-MC100.

50

(Tabla pasa página siguiente)

55

60

65

TABLA 3

Reactividad en inmunotransferencias de anticuerpos presentes en anginas palatinas humanas y sueros recogidos de ratones tras inmunización con preparaciones antigénicas de *M. catarrhalis* con el polipéptido recombinante de fusión de SHB-MC100 marcado con His

Polipéptido recombinante purificado I.D. ¹	Peso molecular aparente (kDa) ²	Reactividad en inmunotransferencias con	
		Anginas palatinas humanas ³	Sueros de ratón ⁴
SHB-MC100	25	+	+

¹El polipéptido recombinante marcado con His producido y purificado como se describe en el Ejemplo 5 se usó para realizar las inmunotransferencias.

²El peso molecular del polipéptido recombinante marcado con His se estimó después de la SDS-PAGE.

³Los extractos de las anginas palatinas humanas no se diluyeron con el fin de realizar las inmunotransferencias.

⁴Los sueros de ratón recogidos tras la inmunización con polipéptidos de membrana enriquecidos con preparaciones antigénicas de *M. catarrhalis* se combinaron y diluyeron a 1/500 para realizar las inmunotransferencias. Estos ratones estaban protegidos frente a la exposición a *M. catarrhalis*.

Ejemplo 7

Este ejemplo ilustra la accesibilidad a los anticuerpos de los polipéptidos SHB-MC100 y SHB-MC101 en la superficie de la cepa de *M. catarrhalis*.

Las bacterias se cultivaron en caldo de infusión de cerebro corazón (BHI) que contenía 1% de dextrosa a 37°C en atmósfera de 8% de CO₂ para dar una DO_{490nm} de 0,650 (~ 10⁸ UFC/ml). A continuación se añadieron las diluciones de anti-SHB-MC100 o anti-SHB-MC101 o sueros control y se dejaron unir a las células, que se incubaron durante 2 h a 4°C con rotación. Las muestras se lavaron 4 veces en tampón de bloqueo [solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene 2% de seroalbúmina bovina (BSA)] y después se añadió 1 ml de fragmento Fc de IgG anti-ratón conjugado con fluoresceína (FITC) de cabra específico diluido en tampón de bloqueo. Tras una incubación adicional de 60 minutos a temperatura ambiente con rotación en oscuridad, las muestras se lavaron 4 veces en tampón de bloqueo y se fijaron con 0,25% de formaldehído en tampón PBS durante 18 horas a 4°C. Las células se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta que se analizaron mediante citometría de flujo (Epics® XL; Beckman Coulter, Inc.). El análisis de citometría de flujo reveló que los anticuerpos específicos de SHB-MC100 y SHB-MC101 reconocían con eficacia sus correspondientes epítomos expuestos en la superficie de la cepa heteróloga ETSU 658 de *M. catarrhalis* analizada (Tabla 4). Se determinó que más del 70% de las 10.000 células de *Moraxella* analizadas se marcaron con los anticuerpos presentes en los sueros específicos de SHB-MC100 y SHB-MC101. Estas observaciones claramente demuestran que los polipéptidos SHB-MC100 y SHB-MC101 son accesibles en la superficie, donde pueden ser fácilmente reconocidos por los anticuerpos. Se demostró que los anticuerpos anti-*M. catarrhalis* desempeñaban un papel importante en la protección contra la infección producida por *M. catarrhalis*.

TABLA 4

Evaluación de la unión de los anticuerpos específicos de SHB-MC100 y SHB-MC101 en la superficie de células intactas de la cepa de M. catarrhalis ETSU-658

Identificación del suero	Índice de fluorescencia ²	% de células marcadas ³
Combinación de sueros específicos de SHB-MC100 ¹	10,0	85,9
Combinación de sueros específicos de SHB-MC101	6,1	70,7
Combinación de sueros control negativos ⁴	1,0	1,0
Cueros control positivos	22,5	72,4

¹ En los ratones se inyectó por vía subcutánea cinco veces a intervalos de dos semanas 20 µg de polipéptidos recombinantes purificados mezclados con 10 µg de adyuvante QuilA (Cedarlane Laboratories, Hornby, Canadá). Los sueros se diluyeron a 1/50.

² El índice de fluorescencia se calculó como la mediana del valor de fluorescencia obtenido después de marcar las células con un suero inmune dividido por el valor de fluorescencia obtenido para un suero control de ratón. Un valor de fluorescencia de 1 indicó que no había unión de anticuerpos en la superficie de las células intactas de Moraxella. ³% de células marcadas de las 10.000 células analizadas.

⁴ Los sueros recogidos de ratones no inmunizados o inmunizados de forma simulada se combinaron, se diluyeron a 1/50 y se usaron como controles negativos para este ensayo.

⁵ El suero obtenido de un ratón inmunizado con 20 µg de polipéptidos de membrana externa purificados de la cepa de M. catarrhalis ETSU-658 se diluyó a 1/1000 y se usó como control positivo para el ensayo.

Ejemplo 8

Este ejemplo ilustra las actividades bactericidas de los sueros de ratón anti- polipéptido recombinante. Las bacterias se sembraron en placa de agar chocolate y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 8% de CO₂ durante 16 horas. A continuación, las células bacterianas se resuspendieron en tampón de bacteriolisis [10% de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) y 1% de caseína hidrolizada, pH 7,3] hasta una DO_{490nm} de 0,25 y se diluyeron a 8 x 10⁴ UFC/ml. El ensayo bactericida se realizó mezclando 25 µl de la suspensión bacteriana con 50 µl de suero problema diluido inactivado con calor y 15 µl de HBSS e incubando durante 15 min a 37°C, 8% de CO₂ con agitación (200 rpm). A continuación, el suero que contiene complemento de conejo se añadió hasta una concentración final de 10% y la mezcla se incubó durante 60 minutos adicionales a 37°C, 8% de CO₂ con agitación (200 rpm). Al final del periodo de incubación, se determinó el número de bacterias viables sembrando 10 µl de la mezcla de ensayo en placa de agar chocolate. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 8% de CO₂ durante 18-24 horas. El control consistió en bacterias incubadas con sueros inactivados con calor recogidos de ratones antes de la inmunización y del complemento de conejo. La celda ETSU 658 de *M. catarrhalis* se usó para evaluar la actividad bactericida de los sueros. El título bactericida se determinó como la dilución más elevada del suero que tiene como resultado la muerte del 50% o más de las bacterias con respecto al control.

Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra la protección de los ratones contra la infección producida por *M. catarrhalis* inducida mediante inmunización con polipéptidos recombinantes purificados.

Grupos de 8 ratones hembra BALB/c (Charles River) se inmunizaron por vía subcutánea con 20 µg de polipéptidos recombinantes SHB-MC100 o SHB-MC101 en presencia de 10% de adyuvante QuilA (Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, Canadá) o, como control, con adyuvante QuilA solo en PBS. Las muestras de sangre se recogieron del seno orbital los días 0, 14, 28, 42 y 56 antes de cada inmunización y 14 días (día 70) tras la quinta inyección. Una semana después, los ratones fueron expuestos por vía intrapulmonar con aproximadamente 1x10⁶ UFC de la cepa heteróloga de *M. catarrhalis* ETSU-658. Las muestras del inóculo de exposición a *M. catarrhalis* se sembraron en placas de agar chocolate para determinar las UFC y para verificar la dosis de exposición. Los ratones se sacrificaron mediante inyección intraperitoneal de fenobarbital sódico (EuthanylTM) 5 horas después de la infección. Se procedió a la escisión de los pulmones intactos y se homogeneizaron en un homogeneizador tisular. Los homogeneizados pulmonares se evaluaron para determinar el aclaramiento bacteriano mediante siembra de diluciones seriadas para la determinación de las UFC. Como se muestra en la Tabla 5, el número de bacterias recuperadas a las 5 horas de la exposición se redujo significativamente para los grupos inmunizados con polipéptidos SHB-MC100 o SHB-MC101 en comparación con el grupo control. Por tanto, la inmunización con polipéptidos recombinantes SHB-MC100 y SHB-MC101 estimuló el rápido aclaramiento de una cepa heteróloga de *M. catarrhalis* de los pulmones de los ratones.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 5

Aclaramiento pulmonar de Moraxella catarrhalis mediante ratones inmunizados con cualquiera de los polipéptidos recombinantes purificados SHB-MC100 o SHB-MC101

Antígeno	Recuperación bacteriana del grupo control (UFC/ml de homogeneizado pulmonar) ^a	Recuperación bacteriana del grupo inmunizado (UFC/ml de homogeneizado pulmonar) ^b	Aclaramiento bacteriano (%) ^c
SHB-MC100	$2,4 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^5$	$4,7 \times 10^4 \pm 4,7 \times 10^4$	80,4 ^d
SHB-MC101	$2,4 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^5$	$7,6 \times 10^4 \pm 8,9 \times 10^4$	68,3 ^e
^a Medias $\pm$ desviaciones estándar para siete ratones. ^b Medias desviaciones estándar para ocho ratones. ^c Los ratones recibieron una exposición intrapulmonar con 1×10^6 UFC de bacterias y las bacterias viables se recuperaron de los pulmones 5 horas después de la exposición. El número es el porcentaje de bacterias aclaradas de ratones inmunizados en comparación con el del control. ^d P= 0,0030; la significación se determinó mediante el análisis no paramétrico de Mann-Whitney. ^e P= 0,0379; la significación se determinó mediante el análisis no paramétrico de Mann-Whitney.			

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado constituido por una secuencia nucleotídica que es idéntica en al menos un 80% a la secuencia nucleotídica que se expone en la SEC ID N° 1, en la que el polinucleótido codifica un polipéptido que tiene la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria a *Moraxella catarrhalis* y que tiene la capacidad de producir anticuerpos que poseen especificidad por un polipéptido constituido por la secuencia aminoacídica expuesta en la SEC ID N° 2.
2. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1 constituido por una secuencia nucleotídica idéntica en al menos un 90% a la secuencia nucleotídica expuesta en la SEC ID N°:1.
3. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1 constituido por una secuencia nucleotídica idéntica en al menos un 95% a la secuencia nucleotídica expuesta en la SEC ID N°:1.
4. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1 que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:2.
5. El polinucleótido aislado de la reivindicación 1 constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:1
6. El polinucleótido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el polinucleótido codifica un polipéptido que carece de un péptido líder en el extremo N.
7. El polinucleótido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el polinucleótido es ARN o ADN.
8. Un polinucleótido aislado constituido por una secuencia de nucleótidos que es complementaria al polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Un vector que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el polinucleótido está operablemente unido a una región de control de la expresión.
10. Una célula huésped aislada transfeccionada con el vector de acuerdo con la reivindicación 9.
11. Un procedimiento para producir un polipéptido codificado por el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y expresado por el vector de la reivindicación 9, en el que dicho procedimiento comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 10 en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, que además comprende recuperar el polipéptido expresado del cultivo de células huésped.
13. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 80% a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 2, en el que el polipéptido aislado tiene la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria a *Moraxella catarrhalis* y tiene la capacidad de producir anticuerpos que tienen especificidad por un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 2.
14. El polipéptido aislado de la reivindicación 13, que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90% a la secuencia nucleotídica expuesta en la SEC ID N°:2.
15. El polipéptido aislado de la reivindicación 13, que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 95% a la secuencia nucleotídica expuesta en la SEC ID N°:2.
16. El polipéptido aislado de la reivindicación 13 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:2.
17. El polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en el que el polipéptido carece de un péptido líder en el extremo N.
18. El polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 13-17, que además comprende una marca.
19. Un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2 o un fragmento del mismo, en el que el fragmento comprende al menos 10 aminoácidos contiguos de la SEC ID N°:2.
20. Uso del polipéptido aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 13-17, o el polipéptido quimérico de acuerdo con la reivindicación 19 en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria contra *Moraxella catarrhalis*.

ES 2 316 627 T3

21. Una composición vacunal que comprende (a) un polipéptido aislado que tiene una identidad de al menos un 80% con un polipéptido que comprende la SEC ID N°: 2, y (b) un vehículo, adyuvante o diluyente.

5 22. La composición vacunal de la reivindicación 21, en la que el polipéptido aislado tiene una identidad de al menos un 90% con el polipéptido que comprende la SEC ID N°:2.

23. La composición de vacuna de la reivindicación 21, en la que el polipéptido aislado tiene una identidad de al menos un 95% con el polipéptido que comprende la SEC ID N°:2.

10 24. La composición vacunal de la reivindicación 21, en la que el polipéptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:2.

15 25. Una composición vacunal que comprende (a) un polipéptido aislado capaz de producir anticuerpos que tienen especificidad de unión por un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, y (b) un vehículo, adyuvante o diluyente.

20 26. Una composición de vacuna que comprende un fragmento polipeptídico antigénico/inmunogénico de SEC ID N°: 2 y un vehículo, adyuvante o diluyente, en el que el fragmento polipeptídico es capaz de producir anticuerpos que tienen especificidad de unión por un polipéptido que comprende la SEC ID N°: 2.

27. La composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 21-26, en la que el polipéptido aislado o el fragmento polipeptídico antigénico/inmunogénico es parte de un polipéptido quimérico.

25 28. Una composición farmacéutica que comprende (a) un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 85% con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2, y (b) un vehículo, adyuvante o diluyente.

30 29. La composición farmacéutica de la reivindicación 28, en la que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 90% a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2.

30 30. La composición farmacéutica de la reivindicación 28, en la que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 95% a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 2.

35 31. La composición farmacéutica de la reivindicación 28, en la que el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:2.

32. La composición farmacéutica de la reivindicación 28, en la que el polinucleótido aislado comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°:1.

40 33. La composición farmacéutica de la reivindicación 28, que comprende (a) un polinucleótido que hibrida en condiciones estrictas con un polinucleótido que tiene una identidad de al menos un 95% con la secuencia de nucleótidos expuesta en la SEC ID N°:1, y (b) un vehículo, adyuvante o diluyente.

45 34. Una composición farmacéutica que comprende (a) un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido capaz de producir anticuerpos que tienen especificidad de unión por un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°:2, y (b) un vehículo, adyuvante o diluyente.

50 35. Un procedimiento para producir una composición vacunal de una cualquiera de las reivindicaciones 21-27 mediante técnicas recombinantes, en el que dicho procedimiento comprende expresar un polinucleótido que codifica dicho polipéptido en una célula huésped y recuperar el producto polipeptídico expresado y formular con un vehículo, adyuvante o diluyente.

55 36. Uso de una composición de vacuna de una cualquiera de las reivindicaciones 21-27 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 28-34 en la fabricación de un medicamento para usar en tratamiento profiláctico de una infección producida por *Moraxella*.

60

65

Figura 1

```

1 GTGGTGCTGG GCTTGGCATT GCTGCTTGTT CACCCCAATC TCCAACAGTC GCAGAACATC
61 AGCCGCAACA ACAAGAACCT CTACAATACA CCAACGCTGA AGCACAAGCA CTTCAAGAGC
121 AAGCCGCCGC CTTACAAGCC CAAGCTGCCG AGCTTGAAAT GCAAGCTCAA GAAGCACAAG
181 CAGATGCCAG CCATGAAACC AAGGCAACTT CTGCCGATGG TAGCGGTGTC GGTAGCCTAC
241 TGGCAGGTGC TGGCGCAGGT GCTGCGGCAG GTTATGTTGC AAGCAAAGTT GCTGGTAATC
301 GTGCTGCTAC CGCTCAAGCT TCACAAACCG CCAAACACC AACAAACCACA CAACAACCAG
361 CACAAAATAA CCAACAAGCC ACCAACAGCA ATCGCCAAAG CCTCGCTCAA GCCACCCAAG
421 ACAACCGAGC TGGCACCCT CGCCAAGGTT TTGGTGCGAC AGGCGGTGCG ACAGGTTCCG
481 CCTCATGAAG CGTATCACTG TTGCACCACG ACCAGATTGG CAAAGCGAAA TGGCACGCAT
541 TGGCTTTAA (SEC ID N°:1)

```

Figura 2

```

1 VVLGLALLLV HPNLQSQNI SRNNKNLYNT PTLKHKHFKS KPPPYKPKLP SLKCKLKCHK
61 QMPAMKPRQL LPMVAVSVAI WQVLRQVLRQ VMLQAKLLVI VLLPLKLHKP PKHQQPHNNQ
121 HKITNKPPTA IAKASLKPPK TTELAPIAKV LVRQAVRQVR PHEAYHCCTT TRLAKRNGTH
181 WL* (SEC ID N°:2)

```

Figura 3

```

1 GTGAAATTTA AAACATTTGG ACTTATGGCA GCCATTGTTG GTACATTTAG TATCTCAGCT
61 TOTAGCGGTC AAAACGAACA AAGCACAAAA GCCAGTGGTG ACACCTTGCG TATTGCGACC
121 GAAGGCACTT ATGCACCATT TAACTACACC AATCCAGATG GCAGTTTGGG CGGCTTTGAT
181 GTGGATATCG CCAATGCGTT ATGCAACAAA ATGCAAACCG AATGCCAAAT CATTGCCCAA
241 GATTGGGACG GTATTATACC AGCATTAAAA ACAGGTAAGT TTGATGCCAT TGTTGCAGCA
301 ATGTCAGTCA CCCCTGAGCG TAGTGAGCAG GTGGATTTTA GCGAGCCTTA TTTGTCAAC
361 TCTTTGGTAT TTTTGGCAAA AAAAGGTTCA AATTTTGATC CGAGCAGCAC CGATGCCATC
421 AATAATGCCA AAATGTTTGC TCAGCGTTCA ACCATCTCAA GTCAATGGTT AACCCAAACT
481 TATCCAAACA GCAAGCCACA GCTGTACGAT ACGCTGGACA ATGCTTTTAT TGATTTAGGT
541 AATGAGCGTG CTGACGCTAT GATTCTGAC AAACAGCCAG CATTAACTTG GCTTAGCTCG
601 GACTTGGGTC AAAATTTTGA GATCAAAGGT GGGGACATTA ATATCAATGA TAAAGTCTCC
661 ATTGCTGTCG ATAAAGGCAA TACCGCACTA TTACAAAAT TCAATGAGGC TTTGGCTGCA
721 ATCAAGGCTG ATGGCACCTA TAAACAATT GTCATTAAGC ACTTTGGTGA AGCAGGTATG
781 CCAACTAATA TTGAATAA (SEC ID N°:3)

```

Figura 4

```

1 VKFKTFGLMA AIVGTFSSISA CSGONEQSTK NSGDTLRIAT EGTYPFNYT NPDGSLGGFD
61 VDIANALCNK MQTECQIIAQ DWDGIIPALK TGRFDAIVAA MSVTPERSEQ VDFSEPYFVN
121 SLVFLAKKGS NFDPSSTDAI NNAKIVAQRS TISSQWLTQT YPNSKPQLYD TLDNAPIDLG
181 NERADAMISD KLPALTWLSL DLGQNFEIKG GDININDKVS IAVDKGNTAL LQKFNEALAA
241 IKADGTYKQI VIKHFGEAGM PTNIE* SEC ID N°:4

```

ES 2 316 627 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Shire Biochem Inc.

5 <120> POLIPÉPTIDOS DE *MORAXELLA (BRANHAMELLA) CATARRHALIS*
 <130> 74872-87
 <150> US 60/331,441
 <151> 2001-11-16

10 <160> 12
 <170> PatentIn versión 3.0
 <210> 1

15 <211> 549
 <212> ADN
 <213> *Moraxella catarrhalis*

20 <400> 1

	gtggtgctgg	gcttggcatt	gctgcttggt	cacccaatc	tccaacagtc	gcagaacatc	60
	agccgcaaca	acaagaacct	ctacaataca	ccaacgctga	agcacaagca	cttcaagagc	120
	aagccgccgc	cttacaagcc	caagctgccg	agcttgaaat	gcaagctcaa	gaagcacaag	180
25	cagatgccag	ccatgaaacc	aaggcaactt	ctgccgatgg	tagcgggtgc	ggtagcctac	240
	tggcaggtgc	tgcggcaggt	gctgcggcag	gttatgttgc	aagcaaagtt	gctggtaatc	300
	gtgctgctac	cgtcgaagct	tcacaaaccg	cccaaacacc	aacaaccaca	caacaaccag	360
	cacaaaataa	ccaacaagcc	accaacagca	atcgccaaag	cctcgctcaa	gccacccaag	420
	acaaccgagc	tggcaccact	cgccaagggt	ttggtgcgac	aggcgggtgcg	acaggttcgg	480
30	cctcatgaag	cgtatcactg	ttgcaccacg	accagattgg	caaagcgaaa	tggcacgcat	540
	tggctttaa						549

35 <210> 2
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> *Moraxella catarrhalis*

40

45

50

55

60

65

ES 2 316 627 T3

<400> 2

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

<210> 3

50 <211> 798

<212> ADN

<213> *Moraxella catarrhalis*

55

60

65

ES 2 316 627 T3

<400> 3

```

5      gtgaaattta aaacatttgg acttatggca gccattgttg gtacatttag tatctcagct      60
      tgtagcggtc aaaacgaaca aagcacaaaa gccagtgggtg acaccttgcg tattgcgacc      120
      gaaggcactt atgcaccatt taactacacc aatccagatg gcagtttggg cggctttgat      180
      gtggatatcg ccaatgcgtt atgcaacaaa atgcaaaccg aatgccaaat cattgcccaa      240
      gattgggacg gtattatacc agcattaaaa acaggtaagt ttgatgccat tgttgagca      300
      atgtcagtc cccctgagcg tagtgagcag gtggatttta gcgagcctta ttttgtcaac      360
10     tctttggtat ttttggcaaa aaaagggttca aattttgatc cgagcagcac cgatgccatc      420
      aataatgcca aaattgttgc tcagcgttca accatctcaa gtcaatgggtt aaccctaaact      480
      tatccaaaca gcaagccaca gctgtacgat acgctggaca atgcttttat tgatttaggt      540
      aatgagcgtg ctgacgctat gatctctgac aaactgccag cattaacttg gcttagctcg      600
      gacttgggtc aaaattttga gatcaaaggt ggggacatta atatcaatga taaagtctcc      660
15     attgctgtcg ataaaggcaa taccgcacta ttacaaaaat tcaatgaggc tttggctgca      720
      atcaaggctg atggcaccta taaacaaatt gtcattaagc actttggtga agcaggtatg      780
      ccaactaata ttgaataa

```

20 <210> 4

<211> 265

<212> PRT

25 <213> *Moraxella catarrhalis*

<400> 4

```

30     Val Lys Phe Lys Thr Phe Gly Leu Met Ala Ala Ile Val Gly Thr Phe
      1          5          10          15

      Ser Ile Ser Ala Cys Ser Gly Gln Asn Glu Gln Ser Thr Lys Ala Ser
35     20          25          30

      Gly Asp Thr Leu Arg Ile Ala Thr Glu Gly Thr Tyr Ala Pro Phe Asn
      35          40          45

40     Tyr Thr Asn Pro Asp Gly Ser Leu Gly Gly Phe Asp Val Asp Ile Ala
      50          55          60

      Asn Ala Leu Cys Asn Lys Met Gln Thr Glu Cys Gln Ile Ile Ala Gln
45     65          70          75          80

      Asp Trp Asp Gly Ile Ile Pro Ala Leu Lys Thr Gly Lys Phe Asp Ala
      85          90          95

50     Ile Val Ala Ala Met Ser Val Thr Pro Glu Arg Ser Glu Gln Val Asp
      100          105          110

55     Phe Ser Glu Pro Tyr Phe Val Asn Ser Leu Val Phe Leu Ala Lys Lys
      115          120          125

```

60

65

ES 2 316 627 T3

Gly Ser Asn Phe Asp Pro Ser Ser Thr Asp Ala Ile Asn Asn Ala Lys
 130 135 140
 5 Ile Val Ala Gln Arg Ser Thr Ile Ser Ser Gln Trp Leu Thr Gln Thr
 145 150 155 160
 10 Tyr Pro Asn Ser Lys Pro Gln Leu Tyr Asp Thr Leu Asp Asn Ala Phe
 165 170 175
 15 Ile Asp Leu Gly Asn Glu Arg Ala Asp Ala Met Ile Ser Asp Lys Leu
 180 185 190
 20 Pro Ala Leu Thr Trp Leu Ser Ser Asp Leu Gly Gln Asn Phe Glu Ile
 195 200 205
 25 Lys Gly Gly Asp Ile Asn Ile Asn Asp Lys Val Ser Ile Ala Val Asp
 210 215 220
 30 Lys Gly Asn Thr Ala Leu Leu Gln Lys Phe Asn Glu Ala Leu Ala Ala
 225 230 235 240
 35 Ile Lys Ala Asp Gly Thr Tyr Lys Gln Ile Val Ile Lys His Phe Gly
 245 250 255
 40 Glu Ala Gly Met Pro Thr Asn Ile Glu
 260 265

<210> 5

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 5

gggactcca tatgcagtcg cagaacatca gccg

34

<210> 6

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 6

attatatagc ggccgcaagc caatgcgtgc catttc

36

<210> 7

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 316 627 T3

	<223> Cebador	
	<400> 7	
5	ggcagatctt gcagtcgcag aacatcagcc g	31
	<210> 8	
10	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 8	
20	acgcgtcgac ttaaagccaa tgcgtgccat ttc	33
	<210> 9	
	<211> 38	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<400> 9	
35	catttagtat ccatatgtgt agcgggtcaaa acgaacaa	38
	<210> 10	
	<211> 39	
40	<212> ADN	
	<213> Cebador	
	<400> 10	
45	caatcttattc tcgagttcaa tattagttgg catacctgc	39
	<210> 11	
50	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador	
	<400> 11	
60	ctaggatcct tgtagcggtc aaaacgaaca a	31
	<210> 12	
	<211> 36	
65	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	

ES 2 316 627 T3

<223> Cebador

<400> 12

5 cagaagcttt tattcaatat tagttggcat acctgc

36

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65