



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 133**

51 Int. Cl.:

C07K 14/315 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 14/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01959633 .7**

86 Fecha de presentación : **08.08.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1320542**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2003**

54 Título: **Ácidos nucleicos de polipéptidos de estreptococos del grupo B y composiciones terapéuticas y vacunas de los mismos.**

30 Prioridad: **08.08.2000 US 634341**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

73 Titular/es:
**ST. JUDE CHILDREN'S RESEARCH HOSPITAL
332 North Lauderdale
Memphis, Tennessee 38105-2794, US
University of Utah Research Foundation**

72 Inventor/es: **Adderson, Elisabeth y
Bohnsack, John**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Ácidos nucleicos de polipéptidos de estreptococos del grupo B y composiciones terapéuticas y vacunas de los mismos.

Ayuda gubernamental

La investigación que condujo a la presente invención fue apoyada, por lo menos en parte, por una beca del NAID, beca nº A140918. Por lo tanto, el Gobierno puede ostentar determinados derechos sobre la invención.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la proteína adhesina con matriz extracelular (Ema), EmaA, a los anticuerpos para la misma y a las vacunas, composiciones y productos terapéuticos.

La invención se refiere también a la identificación y prevención de infecciones por estreptococos y a los ácidos nucleicos aislados que codifican EmaA.

Antecedentes de la invención

Los estreptococos son cocos gram positivos negativos a la catalasa. Pueden clasificarse por el tipo de hemólisis presentada en agar-agar con sangre, por la detección serológica de antígenos de carbohidrato, o por determinadas reacciones bioquímicas. Los estreptococos clínicamente importantes incluyen los Grupos A, B, D y S de neumonías y el grupo de viridanos de estreptococos. *Streptococcus pyogenes* (Grupo A) de tipo A de Lancefield es un patógeno humano importante, causa de la faringitis estreptocócica, impétigo y de infecciones más graves tales como bacteriemia y fascitis necrotizante. Las secuelas inmunológicas de las infecciones estreptocócicas del Grupo A constituyen asimismo importantes problemas de salud -la carditis reumática es la causa más común de enfermedad cardíaca adquirida en el mundo y la glomerulonefritis postestreptocócica es una causa de hipertensión y de disfunción renal. Los estreptococos agalactiae son la causa más común de infecciones bacterianas graves en recién nacidos e importantes patógenos en mujeres embarazadas y adultas no embarazadas con problemas médicos subyacentes tales como la diabetes y la enfermedad cardiovascular. Los estreptococos del Grupo D incluyen los enterococos (*Streptococcus faecalis* y *faecium*) y los estreptococo del grupo D “no enterocócicos”. El *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) no está clasificado por grupo en el sistema Lancefield. Los nemococos son patógenos humanos extremadamente importantes, la causa más común de neumonía bacteriana, infecciones del oído medio y meningitis tras el periodo neonatal. El grupo viridans de estreptococos incluye *S. milleri*, *S. mitis*, *S. sanguis* y otros. Causan bacteriemia, endocarditis e infecciones dentales. Los enterococos son causas importantes de infecciones del tracto urinario, bacteriemia e infecciones de heridas (de forma predominante como infecciones nosocomiales en pacientes hospitalizados), y endocarditis. Durante la última década, los enterococos han desarrollado una resistencia a numerosos antibióticos convencionales y existen algunas cepas resistentes a todos los antibióticos conocidos.

Los estreptococos del Grupo B (GBS) son la causa más común de enfermedades bacterianas graves en recién nacidos, y constituyen importantes patógenos en mujeres embarazadas y en adultos con enfermedades subyacentes (Baker C.J. (2000) “Group B streptococcal infections” en *Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis*. (D. L. Stevens y E. L. Kaplan), New York: Oxford University Press, 222-237). Las manifestaciones comunes de estas infecciones incluyen bacteriemia, neumonía, meningitis, endocarditis, e infecciones osteoarticulares (Baker C.J. (2000) “Group B streptococcal infections” en *Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis*. (D. L. Stevens y E. L. Kaplan), New York: Oxford University Press, 222-237; Blumberg H.M. *et al.* (1996) *J Infect Dis* 173:365-373). La incidencia de la enfermedad por GBS invasiva es de aproximadamente 2,6 por 1.000 nacimientos y de 7,7 por 100.000 en la población mundial, con índices de mortalidad comprendidos entre 6 y 30% (Baker C.J. (2000) “Group B streptococcal infections” en *Streptococcal infections*.

Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis. (D. L. Stevens y E. L. Kaplan), New York: Oxford University Press, 222-237; Blumberg H.M. *et al.* (1996) *J Infect Dis* 173:365-373). Aunque muchas enfermedades neonatales se pueden prevenir mediante la administración de antibióticos profilácticos a mujeres parturientas, los programas de profilaxis con antibióticos pueden resultar ineficaces, resultan insatisfactorios o fallan si surge una resistencia al antibiótico. No se ha establecido ninguna estrategia de profilaxis efectiva para infecciones en adultos.

Durante el parto, los GBS pueden pasar de la madre al recién nacido. Según una estimación, hasta el 30% de mujeres embarazadas portan GBS por lo menos temporalmente en la vagina o en el recto sin síntomas. Los bebés de estas mujeres se colonizan con GBS durante el parto (Baker, C.J. y Edwards, M.S. (1995) “Group B Streptococcal Infections” en *Infectious Disease of the Fetus and Newborn Infant* (J.S. Remington y J.O Klein), 980-1054). La aspiración de fluido amniótico o secreciones vaginales infectados permiten que los GBS accedan a los pulmones. La adhesión a y la invasión del epitelio y endotelio respiratorio parecen ser factores críticos en la infección neonatal de aparición temprana (Baker, C.J. y Edwards, M.S. (1995) “Group B Streptococcal Infections” en *Infectious Disease of the Fetus and Newborn Infant* (J. S. Remington y J.O Klein); 980-1054; Rubens, C.E. *et al.* (1991) *J Inf Dis* 164:320-330). No se han clarificado las etapas subsiguientes en la infección, tales como la invasión del flujo sanguíneo y el establecimiento de infecciones locales metastásicas. Tampoco se entiende bien la patogénesis de infecciones neonatales que aparecen tras la primera semana de vida. La colonización gastrointestinal puede resultar más importante

que un foco respiratorio en una enfermedad neonatal de aparición tardía (Baker, C.J. y Edwards, M.S. (1995) "Group B Streptococcal Infections" en *Infectious Disease of the Fetus and Newborn Infant* (J.S. Remington y J.O. Klein), 980-1054). Unas pruebas importantes indican que la invasión de las células endoteliales microvasculares del cerebro por GBS resulta la etapa inicial en la patogénesis de la meningitis. Los GBS pueden invadir las células endoteliales microvasculares del cerebro humano y los GBS de tipo III, que son responsables de la mayoría de meningitis, realiza esto 2 a 6 veces más eficientemente que otros serotipos (Nizet, V. *et al* (1997) *Infect Immun* 65:5074-5081).

Debido a que los GBS están ampliamente distribuidos ente la población y resulta un importante patógeno en los recién nacidos, se realizan comúnmente pruebas a las mujeres embarazadas para determinar si presentan GBS en las semanas 35 a 37 del embarazo. Gran parte de la enfermedad neonatal por GBS puede prevenirse mediante la administración de antibióticos profilácticos durante el parto a mujeres que resultan positivas en el análisis o muestran factores de riesgo conocidos. Sin embargo, los programas de antibióticos no previenen la totalidad de la enfermedad por GBS. Los programas resultan deficientes por una serie de razones. En primer lugar, los programas pueden resultar ineficaces. En segundo lugar, resulta difícil asegurar que los proveedores de servicios sanitarios y los pacientes siguen las pruebas y el tratamiento. Y finalmente, si aparecen nuevos serotipos o resistencia al antibiótico, los programas de antibióticos pueden fracasar totalmente. Las pruebas disponibles actualmente para GBS resultan ineficaces. Estas pruebas pueden proporcionar falsos negativos. Además, las pruebas no son específicas para las cepas virulentas de GBS. Por lo tanto, puede proporcionarse el tratamiento con antibióticos de manera innecesaria y añadirse al problema de la resistencia al antibiótico. Aunque podría resultar ventajosa una vacuna, no existe aún ninguna disponible comercialmente.

Tradicionalmente, los GBS se dividen en 9 serotipos según la reactividad inmunológica de la cápsula polisacárida (Baker C.J. (2000) "Group B streptococcal infections" en *Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis*. (D.L. Stevens and E.L. Kaplan), New York: Oxford University Press, 222-223; Blumberg H.M. *et al.* (1996) *J Infect Dis* 173:365-373; Kogan, G. *et al.* (1996) *J Biol Chem* 271:8786-8790). Los GBS de serotipo III resultan particularmente importantes en los neonatos humanos, causando del 60 al 70% de la totalidad de las infecciones y casi la totalidad de las meningitis (Baker C.J. (2000) "Group B streptococcal infections" en *Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis*. (D.L. Stevens y E.L. Kaplan), New York: Oxford University Press, 222-237). Los GBS de tipo III pueden subdividirse en tres grupos de cepas relacionadas sobre la base del análisis de los patrones de digestión de restricción (RDP) producidos por la digestión del ADN cromosómico con *Hind* III y *Sse*8387. (I. Y. Nagano *et al.* (1991) *J Med Micro* 35:297-303; S. Takahashi *et al.* (1998) *J Inf Dis* 177:1116-1119).

Por encima del 90% de las enfermedades neonatales por GBS de tipo III invasivas en Tokio, Japón y en Salt Lake City, Utah, están causadas por bacterias de uno de los tres tipos de RDP, calificadas del tipo III-3 de RDP, mientras que el tipo III-2 de RDP es considerablemente más probable de resultar aislado de la vagina que de la sangre o CSF. Estos resultados sugieren que este grupo relacionado genéticamente de los GBS de tipo III-3 es más virulento que las cepas III-2 y podría ser responsable de la mayoría de enfermedades de tipo III invasivas de manera global.

Las vacunas preliminares para los GBS utilizaron polisacárido purificado no conjugado. Los poli- y oligosacáridos de GBS son muy poco inmunógenos y no producen ni memoria ni respuestas de refuerzo significativas. Baker *et al* inmunizaron a 40 mujeres embarazadas con polisacárido capsular de serotipo III (Baker, C.J. *et al.* (1998) *New Engl J of Med* 319:1180-1185). En general, únicamente el 57% de las mujeres con niveles bajos de anticuerpo específico respondieron a la vacuna. La escasa inmunogenicidad del antígeno polisacárido purificado se demostró además en un estudio en el que treinta voluntarios adultos fueron inmunizados con una vacuna tetravalente compuesta de polisacárido purificado de los serotipos Ia, II y III (Kotloff, K.L. *et al.* (1996) *Vaccine* 14:446:450). Aunque segura, esta vacuna fue únicamente moderadamente inmunógena, respondiendo únicamente el 13% de los sujetos al tipo Ib, el 17% al tipo II, el 33% al tipo Ia, y el 70% al polisacárido de tipo III. La escasa inmunogenicidad de los antígenos de polisacárido provocó esfuerzos para desarrollar las vacunas conjugadas de polisacárido, por lo que estos poli- u oligosacáridos están conjugados a los portadores de proteína. El noventa por ciento de las mujeres adultas sanas inmunizadas con una vacuna conjugada de polisacárido de tipo III y de toxoide tetánico respondió con una aumento cuadruplicado en la concentración de anticuerpo, en comparación con el 50% inmunizado con únicamente polisacárido (Kasper, D.L. *et al* (1996) *J of Clin Invest* 98:2308-2314). Un tipo de vacuna conjugada de polisacárido de tipo Ia/Ib y de toxoide tetánico fue igualmente más inmunógeno en adultos sanos que el polisacárido solo (Baker, C.J. *et al* (1999) *J Infect Dis* 179:142-150).

La desventaja que presentan las vacunas de conjugado de proteína y polisacárido consiste en que el procedimiento de purificación y conjugación de los polisacáridos resulta dificultosa, ocupa mucho tiempo y resulta cara. Un antígeno de proteína que podría resultar más económico y de fácil producción podría comportar una mejora.

En caso de preparar una vacuna conjugada de polisacárido y proteína, una proteína portadora específica para GBS puede resultar preferida para uno de los portadores comúnmente utilizados tales como los toxoides tetánicos o diftéricos debido a los problemas potenciales asociados a algunas de estas proteínas portadoras, particularmente la inmunogenicidad variable y los problemas asociados a la vacunación repetida con la misma proteína portadora. La selección de las proteínas portadoras adecuadas resulta importante para el desarrollo de las formulaciones de vacuna de polisacárido y proteína. Por ejemplo, el poli- u oligosacárido de tipo b de *Haemophilus influenzae* conjugado a diferentes portadores de proteínas presenta una inmunogenicidad variable y provoca un anticuerpo con avidez variable (Decker, M.D. *et al* (1992) *J Pediatrics* 120:184-189; Schlesinger, Y. (1992) *JAMA* 267:1489-1494). La inmunización repetida con la misma proteína portadora puede asimismo suprimir las respuestas inmunes por competencia para las

células B específicas (supresión epitópica) u otros mecanismos. Esto resulta de particular interés para el desarrollo de vacunas de GBS ya que la totalidad de las vacunas de conjugado de poli/oligosacárido y proteína desarrolladas recientemente contra las bacterias *H. influenzae*, *S. Pneumoniae*, y *N. Meningitis* utilizan un número limitado de proteínas portadoras (toxoides tetánico, CRM197, toxoide diftérico), aumentando el número de exposiciones a estos portadores que es probable que reciba un individuo. Además, utilizar el tétano como una proteína portadora no ofrece ninguna ventaja específica más que la inmunogenicidad mejorada de la vacuna. Una vacuna de segunda generación que contiene una proteína portadora específica para GBS podría potenciar la inmunogenicidad y presentar una ventaja ya que la respuesta inmune específica para GBS podría ser generada contra la proteína portadora y el poli/oligosacárido.

Por lo tanto, en vista de las deficiencias mencionadas anteriormente relacionadas con las vacunas y procedimientos de la técnica anterior, resultaría evidente que existe todavía una necesidad en la técnica de una vacuna de GBS inmunógena y eficaz. La disponibilidad y la utilización de un polipéptido de GBS en una vacuna conjugada resulta deseable. Un polipéptido de GBS que está presente o expresado en la totalidad de los serotipos de GBS podría presentar la ventaja añadida que consiste en proporcionar inmunidad amplia, general a lo largo de muchos serotipos de GBS. Podría resultar particularmente relevante y útil para proporcionar una vacuna o inmunógeno estreptocócicos que se expresa ampliamente en varias especies estreptocócicas, por lo que la inmunidad amplia o general contra los grupos múltiples y únicos de estreptococos (por ejemplo, el Grupo A, el Grupo B y *S. Pneumoniae*), particularmente contra distintas bacterias estreptocócicas virulentas y clínicamente relacionadas, pudo generarse de este modo. Manganelli y Van de Rijn, *Infection and Immunity* (1999) 50-56, se refiere a la adhesina emb estreptocócica que se une a la matriz extracelular.

Sumario de la invención

Según la presente invención, se proporciona el polipéptido EmaA estreptocócico que es particularmente útil en la identificación y prevención de infecciones por estreptococos.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido EmaA estreptocócico aislado que comprende la SEC. ID. n°: 2 y análogos sustancialmente homólogos, variantes alélicas y fragmentos inmunógenos de las mismas, en el que el análogo sustancialmente homólogo presenta por lo menos el 70% de identidad de secuencia con la SEC. ID. n°: 2.

Preferentemente, el polipéptido está marcado con un marcador detectable.

En el caso en el que se utiliza un marcador radioactivo, tal como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I y ^{186}Re , pueden utilizarse conocidos procedimientos de recuento disponibles actualmente. En el caso en el que el marcador sea una enzima, la detección puede realizarse por cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas utilizadas actualmente, conocidas en la técnica.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona una vacuna o una composición inmunógena que comprende el polipéptido y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Preferentemente, la vacuna o la composición inmunógena comprende además por lo menos un antígeno seleccionado de entre:

- a. polipéptido Spb1 o un fragmento inmunógeno del mismo;
- b. polipéptido Spb2 o un fragmento inmunógeno del mismo;
- c. polipéptido antígeno alfa con proteína C o un fragmento inmunógeno del mismo;
- d. polipéptido Rib o un fragmento inmunógeno del mismo;
- e. polipéptido Lmb o un fragmento inmunógeno del mismo;
- f. polipéptido C5a-asa o un fragmento inmunógeno del mismo;
- g. polisacáridos u oligosacáridos estreptocócicos del Grupo B.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el polipéptido y un portador farmacéuticamente aceptable.

Preferentemente, la composición farmacéutica comprende además un ingrediente activo seleccionado de entre:

- a. los polipéptidos Spb1 y Spb2;
- b. el antígeno alfa con proteína C;
- c. el polipéptido Rib;

- d. el polipéptido Lmb;
- e. el polipéptido C5a-asa;
- 5 f. un polisacárido u oligosacárido estreptocócico del Grupo B; y
- g. una vacuna antiestreptocócica.

Según un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un anticuerpo purificado contra el polipéptido.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un anticuerpo monoclonal contra el polipéptido.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona una estirpe celular inmortal que produce el anticuerpo monoclonal.

Preferentemente, el anticuerpo está marcado con un marcador detectable.

Preferentemente, el marcador se selecciona de entre una enzima, un producto químico que emite fluorescencia y un elemento radioactivo.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos contra el polipéptido, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Preferentemente, la composición farmacéutica comprende además por lo menos un anticuerpo contra una proteína seleccionada de entre Spb1, Spb2, Rib, Lmb, C5a-asa y antígeno alfa con proteína C.

Según un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido.

Preferentemente, el ácido nucleico se selecciona de entre:

- a. la secuencia SEC. ID. n°: 1 de ADN.
- b. una secuencia de ADN que se hibrida con la secuencia SEC. ID. n°: 1 de ADN en condiciones de hibridación a severidad moderada;
- c. una secuencia de ADN capaz de codificar por lo menos una de las secuencias de aminoácidos codificada por una secuencia de ADN de (a) o (b);
- d. una variante degenerada de la misma;
- e. un alelo de la misma; y
- f. un fragmento de la misma que se hibrida con la secuencia SEC. ID. n°: 1 de ADN en condiciones de hibridación normales.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un vector que comprende el ácido nucleico y un activador.

Preferentemente, el activador comprende un activador bacteriano, de levadura, de insecto o de mamífero.

Convenientemente el vector es un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial de levadura (YAC), un bacteriófago o un ADN vírico eucariótico.

En una forma de realización adicional de la presente invención, se proporciona un sistema de vector huésped para la producción de un polipéptido que comprende el vector en una célula huésped adecuada.

Preferentemente, la célula huésped adecuada comprende una célula procariótica o eucariótica.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona una molécula de ADN recombinante que comprende el ácido nucleico.

Preferentemente, la molécula de ADN está operativamente ligada a una secuencia de control de la expresión.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un huésped unicelular transformado con la molécula de ADN recombinante.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona una vacuna de ácido nucleico que comprende la molécula de ADN recombinante.

Según un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un procedimiento para detectar la presencia del polipéptido, en el que el polipéptido se mide de la manera siguiente:

- a. poniendo en contacto una muestra en la que se supone la presencia o actividad del polipéptido, con un anticuerpo contra dicho polipéptido en condiciones que permitan que se produzca la unión del polipéptido al anticuerpo; y

- b. detectando si se ha producido la unión entre el polipéptido procedente de la muestra y el anticuerpo;

en la que la detección de la unión indica la presencia o actividad del polipéptido en la muestra.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para detectar la presencia de una bacteria que tiene un gen que codifica el polipéptido, procedimiento que comprende:

- a. poner en contacto una muestra, en la que se supone la presencia o actividad del polipéptido, con un oligonucleótido que se hibrida con el gen del polipéptido, en condiciones que permiten que se produzca la hibridación específica del oligonucleótido con el gen; y

- b. detectar si se ha producido la hibridación entre el oligonucleótido y el gen;

en el que la detección de la hibridación indica la presencia o actividad de la bacteria en la muestra.

Según un aspecto adicional de la presente invención se proporciona la utilización de la vacuna o de la composición inmunógena para la preparación de un medicamento destinado a la prevención de una infección con una bacteria que expresa el polipéptido.

Según un aspecto adicional de la presente invención se proporciona la utilización de la composición farmacéutica para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una infección con una bacteria que expresa el polipéptido.

Según un aspecto adicional de la presente invención se proporciona la utilización de la composición farmacéutica para la preparación de un medicamento destinado a la provocación de una respuesta inmunitaria en un sujeto que ha sido expuesto a una bacteria estreptocócica o infectado con ella.

Según un aspecto adicional de la presente invención se proporciona la utilización de la composición farmacéutica para la preparación de un medicamento destinado a la prevención de una infección por una bacteria estreptocócica.

Spb1 y Spb2 se describen en el documento WO 00/78787. El antígeno alfa con proteína C se describe en Michel *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (21), 10060-4. Rib se describe en Wästfelt *et al.* (1996) *J. Biol. Chem.* 271 (31), 18892-18897. Lmb se describe en Spellerberg *et al.* (1999) *Infect. Immun.* 67 (2), 871-8. C5a-asa se describe en Chmouyguina *et al.* (1996) *Infect. Immun.* 65 (7), 2387-90.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa las sondas específicas de tipo III-3 del modelo de digesta de restricción (RDP). Hibridación por transferencia de manchas de la sonda DY1-1 con ADN genómico aislado de GBS de tipo III. 10 µg de ADN genómico de cada una de las 62 cepas de GBS de tipo III se transfirió a una membrana de nilón. La sonda DY1-1 radiomarcada se hibridó con ADN de todas las cepas III-3 (filas A-D) incluyendo la cepa de tipo III-3 original (pocillo E-1). La sonda no pudo hibridarse con el ADN de las cepas III-2 (F1-F10, G1-7) incluyendo la cepa original utilizada en la hibridación por substracción (pocillo E 10) y las cepas III-1 (pocillos H1-3; véase la Figura 3). El mismo modelo de hibridación se observó utilizando la sonda DY1-11.

La Figura 2 representa el ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos prevista de *emaA*.

La Figura 3 representa el ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos prevista de *emaB*.

La Figura 4 representa el ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos prevista de *emaC*.

La Figura 5 representa el ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos prevista de *emaD*.

Las Figuras 6 A-D representa el ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos prevista de *emaE*.

La presente invención se refiere al objeto de las reivindicaciones.

Polipéptidos

La presente invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido Ema bacteriano. Se proporcionan polipéptidos Ema bacterianos de estreptococos, enterococos y corinebacterias. La presente invención se refiere específicamente a un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido EmaA de estreptococos. Otros polipéptidos Ema incluyen EmaB, EmaC, EmaD y EmaE, sin embargo, la presente invención se refiere únicamente a EmaA.

Los polipéptidos de la presente invención son adecuados para su utilización en animales que se inmunizan generalmente contra la infección por estreptococos. Los polipéptidos de la presente invención son adecuados para su utilización en animales que se inmunizan generalmente contra la infección por estreptococos del Grupo B, del Grupo A y por *S. pneumoniae*. Los polipéptidos de la presente invención son adecuados para su utilización en animales que se inmunizan contra estreptococos del Grupo B. Estos polipéptidos o fragmentos de péptido de los mismos, cuando se formulan con un adyuvante apropiado, se utilizan en vacunas para la protección contra estreptococos, particularmente estreptococos del Grupo B, y contra otras bacterias con proteínas con reacción cruzada.

Las proteínas de GBS con homólogos de estreptococos fuera del Grupo B han sido identificadas anteriormente (Lachenauer CS y Madoff LC (1997) *Adv. Exp. Med. Biol.* **418**:615-8; Brady L. J. *et al.* (1991) *Infect Immun.* **59**(12):4425-35; Stahlhammer-Carlemalm M. *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* **182**(1):142-129). Stahlhammer-Carlemalm *et al.* han demostrado protección cruzada entre estreptococos del Grupo A y Grupo B debida a proteínas superficiales con reacción cruzada (Stahlhammer-Carlemalm M. *et al.* (2000) *J. Infect. Dis.* **182**(1):142-129). La proteína R28 del estreptococo del grupo A (GAS) y la proteína Rib del estreptococo del grupo B (GBS) son moléculas de la superficie que producen inmunidad protectora contra la infección experimental. Estas proteínas son miembros de la misma familia y reaccionan en cruz inmunológicamente. A pesar de la extensa identidad del resto de aminoácidos, la reactividad cruzada entre R28 y Rib se descubrió que era limitada, como se demuestra por análisis con proteínas muy purificadas y antiseros específicos. No obstante, la inmunización de ratones con R28 purificada proporcionó protección contra la infección letal con cepas de GBS que expresan a Rib, e inmunización con protección proporcionada por Rib contra GAS que expresa a R28. Por lo tanto, R28 y Rib produjeron inmunidad protectora cruzada.

La presente invención se refiere a un polipéptido EmaA estreptocócico aislado que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en la SEC. ID. n°: 2, y análogos sustancialmente homólogos, variantes alélicas y fragmentos inmunógenos de la misma.

La identidad o posición de uno o más restos de aminoácidos puede cambiarse o modificarse para que incluya variantes tales como, por ejemplo, deleciones que contienen no todos los restos especificados para la proteína, sustituciones en la que uno o más restos especificados se sustituyen por otros restos y adiciones en las que uno o más restos de aminoácidos se añaden a una parte terminal o media del polipéptido. Estas moléculas incluyen: la incorporación de codones “preferidos” para la expresión por huéspedes no mamíferos seleccionados; el aporte de puntos para la escisión por enzimas endonucleasa de restricción; y el aporte de secuencias de ADN iniciales, terminales o intermedias adicionales que facilitan la construcción de vectores expresados fácilmente.

La presente invención contempla la utilización de los polipéptidos de estreptococos de la presente invención para pruebas y procedimientos de diagnóstico destinados a determinar y/o controlar la infección por estreptococos. De este modo, la presente invención proporciona un polipéptido EmaA de GBS aislado, marcado con un marcador detectable.

En el caso en el que se utiliza un marcador radioactivo, tal como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I y ^{186}Re , pueden utilizarse conocidos procedimientos de recuento disponibles actualmente. En el caso en el que el marcador sea una enzima, la detección puede realizarse por cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas utilizadas actualmente, conocidas en la técnica.

Tal como se define en la presente memoria, “adherencia” significa la unión no covalente de una bacteria a una célula o secreción humanas que es suficientemente estable para resistir el lavado.

La expresión “adhesina de la matriz extracelular”, “Ema”, “ema” puede utilizarse en la presente memoria indistintamente, y tal como se utiliza en toda la presente solicitud y en las reivindicaciones se refiere al material proteico incluyendo las proteínas simples o múltiples.

Se contemplan asimismo las proteínas y polipéptidos que presentan actividad sustancialmente equivalente o alterada. Puede deliberarse sobre estas modificaciones, por ejemplo, como las modificaciones obtenidas por mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como las obtenidas por mutaciones en huéspedes que son productores de uno o más polipéptidos Ema. Asimismo, la expresión “adhesina de la matriz extracelular (Ema)” pretende incluir dentro de su alcance las proteínas específicamente mencionadas en la presente memoria así como todos los análogos sustancialmente homólogos y las variaciones alélicas.

En otra forma de realización, la presente invención contempla fragmentos de péptido del polipéptido que proceden de los productos de la digestión proteolítica del polipéptido.

El derivado del polipéptido puede tener uno o más grupos químicos unidos a él. El grupo químico puede ser un polímero soluble en agua, un polietilenglicol, un mono-, di-, tri- o tetrapegilado o monopegilado con terminal N.

El acoplamiento de polietilenglicol (PEG) a compuestos es particularmente útil porque el PEG tiene una toxicidad muy baja en mamíferos (Carpenter *et al.*, 1971). Por ejemplo, un aducto de PEG de adenosina desaminasa fue aprobado en los Estados Unidos para su utilización en seres humanos para el tratamiento del síndrome de la inmunodeficiencia combinada grave. Una segunda ventaja proporcionada por la conjugación de PEG es la de reducir eficazmente la inmunogenicidad y la antigenicidad de los compuestos heterólogos. Por ejemplo, un aducto de PEG de una proteína humana puede ser útil para el tratamiento de la enfermedad en otra especie de mamífero sin riesgo de desencadenar una respuesta inmunitaria grave. El compuesto de la presente invención puede administrarse en un dispositivo de microencapsulación a fin de reducir o prevenir una respuesta inmunitaria del huésped contra el compuesto o contra las células que pueden producir el compuesto. El compuesto de la presente invención puede administrarse también microencapsulado en una membrana, tal como en un liposoma.

Se han descrito numerosas formas activadas de PEG adecuadas para la reacción directa con proteínas. Los reactivos de PEG útiles para la reacción con grupos amino de proteínas incluyen los ésteres activos de ácido carboxílico o derivados de carbonato, particularmente aquellos en los que los grupos salientes son N-hidroxisuccinimida, p-nitrofenol, imidazol o 1-hidroxi-2-nitrobenzo-4-sulfonato. Los derivados de PEG que contienen grupos maleimido o haloacetilo son reactivos útiles para la modificación de grupos sulfhidrilo libres de proteínas. Asimismo, los reactivos PEG que contienen grupos aminohidrazina o hidrazida son útiles para la reacción con aldehídos generados por oxidación con peryodato de los grupos carbohidrato en las proteínas.

Los restos de aminoácido del polipéptido descrito en la presente memoria se prefieren al estar en la forma isomérica "L". Los restos en forma isomérica "D" pueden sustituirse por cualquier resto de L-aminoácido, siempre que la propiedad funcional deseada de actividad de lectina sea conservada por el polipéptido. NH₂ se refiere al grupo amino libre presente en el terminal amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el terminal carboxi de un polipéptido. Las abreviaturas utilizadas en la presente memoria están de acuerdo con la nomenclatura de polipéptidos habitual, *J. Biol. Chem.*, **243**:3552-59 (1969).

Debe observarse que todas las secuencias de restos de aminoácidos están representadas en la presente memoria por las fórmulas cuya orientación izquierda y derecha está en la dirección convencional del terminal amino al terminal carboxi. Además, debe observarse que un guión al comienzo o final de una secuencia del resto aminoácido indica un enlace peptídico en una secuencia adicional de uno o más restos de aminoácidos.

El polipéptido sintético, preparado utilizando las técnicas bien conocidas de fase sólida, fase líquida o las técnicas de condensación de péptidos, o cualquier combinación de las mismas, puede incluir aminoácidos naturales y no naturales. Los aminoácidos utilizados para la síntesis de péptidos pueden ser la resina de aminoácido Boc habitual (N^t-butiloxicarbonil protegida con N^o-amino) con los protocolos de desprotección, neutralización, acoplamiento y lavado habituales del procedimiento original en fase sólida de Merrifield (1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154), o con los aminoácidos 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) protegidos con N^o-amino con base lábil descritos por primera vez por Carpino y Han (1972, *J. Org. Chem.* 37:3403-3409). De este modo, el polipéptido descrito en la presente memoria puede comprender D-aminoácidos, una combinación de D- y L-aminoácidos y varios aminoácidos "diseñadores" (p. ej., β-metil aminoácidos, α-metil aminoácidos y Nα-metil aminoácidos, etc.) para transportar propiedades especiales. Los aminoácidos sintéticos incluyen ornitina por lisina, fluorofenilalanina por fenilalanina y norleucina por leucina o isoleucina. Además, por asignación de aminoácidos específicos en las etapas de acoplamiento específico, pueden generarse hélices α, espiras β, hojas β, espiras γ y péptidos cíclicos.

Los péptidos pueden comprender un aminoácido especial en el terminal C que incorpora una cadena lateral con CO₂H o CONH₂ para simular una glicina libre o un grupo glicina-amida. Otra manera de considerar este resto especial sería como análogo de aminoácido D o L con una cadena lateral que está constituida por un enlazador o enlace a la perla. El resto C-terminal pseudolibre puede ser de configuración óptica D o L; puede utilizarse una mezcla racémica de isómeros D y L.

Puede incluirse piroglutamato como resto N-terminal del péptido. Aunque el piroglutamato no es adecuado para la secuencia por degradación de Edman, al limitar la sustitución a solamente el 50% de los péptidos en una perla dada con piroglutamato N-terminal, permanecerá suficiente péptido sin piroglutamato en la perla para el secuenciado. Cualquier experto debería reconocer fácilmente que esta técnica se podría utilizar para el secuenciado de cualquier péptido que incorpore un resto resistente a la degradación de Edman en el terminal N. Otros procedimientos para caracterizar péptidos aislados que demuestran actividad deseada se describen con detalle a continuación. La actividad específica de un péptido que comprende un grupo N-terminal bloqueado, p. ej., piroglutamato, cuando el grupo N-terminal específico está presente en el 50% de los péptidos, se demostraría fácilmente comparando la actividad de un péptido completamente bloqueado (100%) con un péptido no bloqueado (0%).

Asimismo se describe la preparación de péptidos que presentan propiedades estructurales mejor definidas, y la utilización de peptidomiméticos, y enlaces peptidomiméticos, tales como los enlaces éster, para preparar péptidos con nuevas propiedades.

Puede generarse un péptido que incorpore un enlace péptido reducido, es decir, $R_1\text{-CH}_2\text{-NH-R}_2$, en la que R_1 y R_2 son restos o secuencias de aminoácido. Un enlace péptido reducido puede introducirse como subunidad dipeptídica. Dicha molécula sería resistente a la hidrólisis del enlace péptido, p. ej., la actividad de proteasa. Dichos péptidos proporcionarían ligandos con función y actividad únicas, tales como vidas medias prolongadas *in vivo* debido a la resistencia a la descomposición metabólica o a la actividad de la proteasa. Además, es bien sabido que en determinados sistemas los péptidos dependientes presentan aumento de actividad funcional (Hruby, 1982, *Life Sciences* 31:189-199; Hruby *et al.*, 1990, *Biochem J.* 268:249-262); asimismo se describe un procedimiento para producir un péptido dependiente que incorpora secuencias aleatorias en todas las demás posiciones.

Un péptido forzado, cíclico o rígido puede prepararse por síntesis, con la condición de que en por lo menos dos posiciones en la secuencia del péptido se inserte un aminoácido o un análogo de aminoácido que proporcione un grupo funcional químico capaz de reticularse para forzar, ciclar o hacer rígido el péptido después del tratamiento para formar la reticulación. La ciclación se favorecerá cuando se incorpore un aminoácido que produzca espiras. Ejemplos de aminoácidos capaces de reticular un péptido son la cisteína para formar disulfuro, el ácido aspártico para formar una lactona o una lactasa, y un quelante tal como el ácido γ -carbonil-glutámico (Gla) (Bachem) para quelar un metal de transición y formar una reticulación. El ácido γ -carboxil glutámico protegido puede prepararse modificando la síntesis descrita por Zee-Cheng y Olson (1980, *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 94:1128-1132). Un péptido en el que la secuencia peptídica comprende por lo menos dos aminoácidos capaces de reticularse puede ser tratado, p. ej., por oxidación de restos de cisteína para formar un disulfuro o por adición de un ión metálico para formar un quelato, a fin de reticular el péptido y formar un péptido forzado, cíclico o rígido.

Asimismo se describen estrategias para preparar sistemáticamente reticulaciones. Por ejemplo, si se incorporan cuatro restos de cisteína en la secuencia peptídica, pueden utilizarse diferentes grupos protectores (Hiskey, 1981, en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, Vol. 3, Gross y Meienhofer, eds., Academic Press: Nueva York, págs. 137-167; Ponsanti *et al.*, 1990, *Tetrahedron* 46:8255-8266). El primer par de cisteínas puede desprotegerse y oxidarse, a continuación el segundo conjunto puede desprotegerse y oxidarse. De esta manera puede formarse una serie definida de reticulaciones de disulfuro. Alternativamente, pueden incorporarse un par de cisteínas y un par de análogos de aminoácido de intercalación de modo que las reticulaciones son de diferente naturaleza química.

Pueden incorporarse los siguientes aminoácidos no clásicos en el péptido a fin de introducir motivos de configuración específicos: 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato (Kazmierski *et al.*, 1991, *J. Am. Chem. Soc.* 113:2275-2283); (2S,3S)-metil-fenilalanina, (2S,3R)-metil-fenilalanina, (2R,3S)-metil-fenilalanina y (2R,3R)-metil-fenilalanina (Kazmierski y Hruby, 1991, *Tetrahedron Lett.*); ácido 2-aminotetrahidronaftaleno-2-carboxílico (Landis, 1989, Tesis doctoral, University of Arizona); hidroxí-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilato (Miyake *et al.*, 1989, *J. Take-da Res. Labs.* 43:53-76); β -carbolina (D y L) (Kazmierski, 1988, Tesis doctoral, University of Arizona); HIC (ácido histidina isoquinolina carboxílico) (Zechel *et al.*, 1991, *Int. J. Pep. Protein Res.* 43); y HIC (histidina urea cíclica) (Dharanipragada).

Los análogos y peptidomiméticos de aminoácidos siguientes pueden incorporarse en un péptido para producir o favorecer estructuras secundarias específicas: LL-Acp (ácido LL-3-amino-2-propenidona-6-carboxílico), análogo de dipéptido que produce una espira β (Kemp *et al.*, 1985, *J. Org. Chem.* 50:5834-5838); análogos que producen la hoja β (Kemp *et al.*, 1988, *Tetrahedron Lett.* 29:5081-5082); análogos que producen la espira β (Kemp *et al.*, 1988, 29:5057-5060); análogos que producen la hélice α (Kemp *et al.*, 1988, *Tetrahedron Lett.* 29:4935-4938); análogos que producen la espira γ (Kemp *et al.*, 1989, *J. Org. Chem.* 54:109-115); y análogos proporcionados por las referencias siguientes: Nagai y Sato, 1985, *Tetrahedron Lett.* 26:647-650; DiMaio *et al.*, 1989, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* pág. 1687; también un análogo de la espira Gly-Ala (Kahn *et al.*, 1989, *Tetrahedron Lett.* 30:2317); isótero con enlace amida (Jones *et al.*, 1988, *Tetrahedron Lett.* 29:3853-3856); tetrazol (Zabrocki *et al.*, 1988, *J. Am. Chem. Soc.* 110:5875-5880); DTC (Samanen *et al.*, 1990, *Int. J. Protein Pep. Res.* 35:501-509); y análogos dados a conocer en Olson *et al.*, 1990, *J. Am. Chem. Sci.* 112:323-333 y Garvey *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.* 56:436. Los miméticos dependientes de la configuración de espiras beta y protuberancias beta y los péptidos que los contienen, se describen en la patente US n° 5.440.013, publicada el 8 de agosto de 1995 por Kahn.

Se describe además la modificación o derivación del polipéptido o péptido. Las modificaciones de los péptidos son bien conocidas por cualquier experto, e incluyen la fosforilación, carboximetilación y acilación. Las modificaciones pueden efectuarse por medios químicos o enzimáticos. En otro aspecto, pueden prepararse derivados peptídicos glucosilados o acilados grasos. La preparación de péptidos glucosilados o acilados grasos es bien conocida en la técnica. También pueden prepararse derivados peptídicos grasos de acilo. A título de ejemplo no limitativo, puede acilarse un grupo amino libre (N-terminal o lisil), p. ej., miristoilarse.

Un aminoácido que comprende una cadena lateral alifática de estructura $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{CH}_3$ puede incorporarse en el péptido. Este y otros conjugados de péptido-ácido graso adecuados para su utilización se dan a conocer en la patente británica GB-8809162.4, solicitud de patente internacional PCT/AU89/00166, y referencia 5, anteriormente.

Grupos químicos para derivación. Los grupos químicos adecuados para la derivación pueden seleccionarse de entre los polímeros solubles en agua. El polímero seleccionado debería ser soluble en agua de modo que el componente al que se une no precipite en un medio acuoso, tal como un medio fisiológico. Preferentemente, para la utilización terapéutica de la preparación del producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable. Un experto en la materia podrá seleccionar el polímero deseado basándose en dichas consideraciones tales como si el conjugado

polímero/componente se utilizará terapéuticamente, y si es así, la dosis deseada, tiempo de circulación, resistencia a la proteólisis y otras consideraciones. Para el presente componente o componentes, estas pueden determinarse utilizando los análisis proporcionados en la presente memoria.

5 El polímero soluble en agua puede seleccionarse de entre el grupo constituido, por ejemplo, por polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, co-
10 polímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados y alcohol polivinílico. El polietilenglicol propionaldehído puede presentar ventajas en la preparación debido a su estabilidad en agua.

El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. Para el polietilenglicol, el peso molecular preferido está comprendido entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa (el término “aproximadamente” indica que en las preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas pesarán más, al-
15 gunas menos, que el peso molecular indicado) para facilidad de manipulación y preparación. Pueden utilizarse otros tamaños, dependiendo de las propiedades terapéuticas deseadas (p. ej., la duración de la liberación lenta deseada, los efectos, si existe actividad biológica, la facilidad en la manipulación, el grado o falta de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol para una proteína o análogo terapéuticos).

20 El número de moléculas de polímero acopladas de esta manera pueden variar, y un experto en la materia podrá determinar el efecto sobre la función. Se puede monoderivar, o se puede proporcionar una o alguna combinación di-, tri-, o tetra- de derivación, con el mismo o diferentes grupos químicos (p. ej., polímeros, tales como de diferentes pesos de polietilenglicoles). La proporción de moléculas de polímero a moléculas de componente o componentes variará, dependiendo de sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la proporción óptima (desde el
25 punto de vista de la eficacia de la reacción en la que no existe componente o componentes sin reaccionar en exceso y polímero) se determinará por los factores tales como el grado deseado de modificación (p. ej., mono, di-, tri-, etc.), el peso molecular del polímero seleccionado, de si el polímero está ramificado o sin ramificar y de las condiciones de reacción.

30 Las moléculas de polietilenglicol (u otros grupos químicos) deberían estar unidos al componente o componentes en consideración de los efectos sobre los dominios funcionales o antigénicos de la proteína. Existen numerosos procedimientos de acoplamiento disponibles para los expertos en la materia, p. ej., el documento EP 0 401 384 (acoplamiento de PEG a G-CSF), véase también Malik *et al.*, 1992, *Exp. Hematol.* 20:1028-1035 (que describe la pegilación de GM-CSF utilizando cloruro de tresilo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede estar unido por enlace covalente por restos
35 de aminoácido mediante un grupo reactivo, tal como, un grupo amino o carboxilo libre. Grupos reactivos son aquellos a los que puede unirse una molécula de polietilenglicol activada. Los restos de aminoácido que tienen un grupo amino libre incluyen los restos de lisina y los restos de aminoácido terminales, aquellos que tienen un grupo carboxilo libre incluyen los restos de ácido aspártico, restos de ácido glutámico y el resto de aminoácido C-terminal. Asimismo pueden utilizarse grupos sulfhidrilo como grupo reactivo para acoplar la(s) molécula(s) de polietilenglicol. Con fines
40 terapéuticos se prefiere el acoplamiento a un grupo amino, tal como el acoplamiento al terminal N o al grupo lisina.

Ácidos nucleicos

Según la presente invención pueden emplearse técnicas de biología molecular, microbiología y de ADN recombinante convencionales dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas están explicadas completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” Volúmenes I-III [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; “Cell Biology: A Laboratory Handbook” Volúmenes I-III [J. E. Celis, ed. (1994)]; “Current Protocols in Immunology” Volúmenes I-III [Coligan, J. E., ed. (1994)]; “Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait ed. 1984); “Nucleic Acid Hybridization” [B. D. Hames y S. J. Higgins eds. (1985)]; “Transcription And Translation” [B. D. Hames y S. J. Higgins eds. (1984)]; “Animal Cell Culture” [R. I. Freshney, ed. (1986)]; “Immobilized Cells And Enzymes” [IRL Press, (1986)]; B. Perbal “A Practical Guide To Molecular Cloning” (1984).

Pueden realizarse mutaciones en un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente invención de modo
55 que se cambie un codón determinado por un codón que codifica un aminoácido diferente. Dicha mutación se realiza generalmente haciendo los menores cambios posibles de nucleótido. Una mutación de sustitución de esta clase puede hacerse para cambiar un aminoácido en la proteína resultante de manera no conservadora (es decir, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos con un determinado tamaño o características por un aminoácido que pertenece a otro grupo) o de manera conservadora (es decir, cambiando el codón de un aminoácido
60 que pertenece a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o características determinados por un aminoácido que pertenece al mismo grupo). Dicho cambio conservador generalmente conduce a menos cambios en la estructura y función de la proteína resultante. Un cambio no conservador es más probable que altere la estructura, actividad o función de la proteína resultante. La presente invención debería considerarse que incluye secuencias que contienen cambios conservadores que no alteran significativamente las características de actividad o unión de la proteína resultante. Los
65 sustitutos para un aminoácido en la secuencia pueden seleccionarse de entre otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen la alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos que contienen estructuras de anillo aromático

son la fenilalanina, triptófano y tirosina. Los aminoácidos polares neutros incluyen la glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen la arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico. Dichas alteraciones no es de esperar que afecten al peso molecular aparente determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida o al punto isoelectrico.

Particularmente los ejemplos de sustituciones son:

- Lys por Arg y viceversa de modo que pueda mantenerse una carga positiva;
- Glu por Asp y viceversa de modo que pueda mantenerse una carga negativa;
- Ser por Thr de modo que pueda mantenerse un -OH libre; y
- Gln por Asn de modo que pueda mantenerse un NH₂ libre.

Las secuencias de ADN sintético permiten la construcción conveniente de genes que expresarán análogos o “mutéinas”. Un procedimiento general para la incorporación específica para el sitio de aminoácidos no naturales en las proteínas se describe en Noren, *et al. Science*, **244**:182-188 (abril de 1989). Este procedimiento puede utilizarse para crear análogos con aminoácidos no naturales.

La presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido Ema de estreptococos.

La presente invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido Ema de estreptococos del Grupo B EmaA, que incluye variantes, alelos y fragmentos del mismo.

El ácido nucleico es ADN, ADNc, ADN genómico o ARN. Además, el ácido nucleico aislado puede estar ligado operativamente a un activador de transcripción del ARN.

La presente invención se refiere también a ácidos nucleicos aislados, tales como moléculas de ADN recombinantes o genes clonados, o a variantes degeneradas de los mismos, alelos o fragmentos de los mismos, que codifican el polipéptido aislado o que inhiben competitivamente la actividad del polipéptido.

La secuencia del ADN de la molécula de ADN recombinante o del gen clonado puede estar operativamente ligada a una secuencia de control de expresión que puede ser introducida en un huésped apropiado. La invención por consiguiente se extiende a huéspedes unicelulares transformados con el gen clonado o la molécula de ADN recombinante que comprenden una secuencia de ADN que codifica una proteína Ema, EmaA.

Un “vector” es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que puede unirse otro segmento de ADN con el fin de efectuar la replicación del segmento acoplado.

Un “ADN” o “molécula de ADN” se refiere a la forma polimérica de desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina o citosina) en su forma monocatenaria, o en una hélice bicatenaria. Esta expresión se refiere solamente a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no limita ninguna forma terciaria concreta. Por lo tanto, esta expresión incluye el ADN bicatenario, entre otros, en moléculas de ADN lineal (p. ej., fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. Al tratar la estructura de determinadas moléculas de ADN bicatenario, pueden describirse las secuencias en la presente memoria según el convenio normal de dar solamente la secuencia en la dirección de 5’ a 3’ a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga con el ARNm).

“Origen de replicación” se refiere a las secuencias de ADN que participan en la síntesis de ADN.

Una “secuencia de codificación” de ADN es una secuencia de ADN bicatenario que está transcrita y se traduce en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación están determinados por un codón de iniciación en el terminal 5’ (amino) y un codón de terminación de la traducción en el terminal 3’ (carboxilo). Una secuencia de codificación puede incluir, pero no se limita, secuencias procarióticas, ADNc de ARNm eucariótico, secuencias de ADN genómico de ADN eucariótico (p. ej., mamífero) e incluso secuencias de ADN de síntesis. Una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción estará situada normalmente 3’ de la secuencia de codificación en el caso del ARNm eucariótico.

Las secuencias de control de la transcripción y de la traducción son secuencias reguladoras de ADN tales como activadores, potenciadores, señales de poliadenilación, terminadores, y similares, que proporcionan la expresión de una secuencia de codificación en una célula huésped.

Una “secuencia activadora” es una zona reguladora de ADN capaz de unir la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia de codificación corriente abajo (dirección 3’). Con el fin de definir la presente invención, la secuencia activadora está unida en su terminal 3’ por el punto de iniciación de la transcripción y se

prolonga corriente arriba (dirección 5') para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Dentro de la secuencia activadora se hallará un punto de iniciación de la transcripción (convenientemente definido por cartografía con nucleasa S1), así como dominios de unión de la proteína (secuencias de consenso) responsables de la unión de ARN polimerasa. Los activadores eucarióticos con frecuencia, pero no siempre, contendrán las secuencias "TATA" y las secuencias "CAT". Los activadores procarióticos contienen secuencias de Shine-Dalgarno además de las secuencias de consenso 10 y 35.

Una "secuencia de control de la expresión" es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y traducción de otra secuencia de ADN. Otra secuencia de codificación esta "bajo el control" de las secuencias de control de la transcripción y de la traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia de codificación en el ARNm, que se traduce a continuación en la proteína codificada por la secuencia de codificación.

Una "secuencia señal" puede incluirse antes de la secuencia de codificación. Esta secuencia codifica un péptido señal, N-terminal en el polipéptido, que comunica a la célula huésped para dirigir el polipéptido a la superficie de la célula o segregar el polipéptido en el medio, y este péptido señal es sujetado por la célula huésped antes que la proteína abandone la célula. Las secuencias señal pueden encontrarse asociadas con una variedad de proteínas naturales a procariotas y eucariotas.

El término "oligonucleótido", tal como se utiliza en la presente memoria para referirse a una sonda se define como una molécula compuesta por dos o más ribonucleótidos, preferentemente más de tres. Su tamaño exacto dependerá de muchos factores que, a su vez, dependen de la función y utilización última del oligonucleótido.

El término "cebador" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido, ya se produzca de forma natural como en una digesta de restricción purificada o se produce por síntesis, que es capaz de actuar como punto de iniciación de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se produce la síntesis de un producto de extensión del cebador, que es complementario con una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente de inducción tal como una ADN polimerasa y a una temperatura y pH adecuados. El cebador puede ser monocatenario o bicatenario y debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis del producto de extensión deseado en presencia del agente inductor. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura, procedencia del cebador y utilización del procedimiento. Por ejemplo, para aplicaciones de diagnóstico, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador del oligonucleótido contiene típicamente de 15 a 25 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos.

Los cebadores en la presente memoria se seleccionan para que sean "sustancialmente" complementarios con diferentes cadenas de una secuencia de ADN diana determinada. Esto significa que los cebadores deben ser suficientemente complementarios para hibridarse con sus cadenas respectivas. Por consiguiente, la secuencia de cebador no necesita reflejar la secuencia exacta de la plantilla. Por ejemplo, un fragmento de nucleótido no complementario puede unirse al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia de cebador complementario con la cadena. Alternativamente, pueden intercalarse bases no complementarias o secuencias más largas en el cebador, con la condición de que la secuencia de cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia de la cadena para hibridarse con ella y de este modo formar la plantilla para la síntesis del producto de la ampliación.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "endonucleasas de restricción" y "enzimas de restricción" se refieren a enzimas bacterianas, cada una de las cuales corta el ADN bicatenario en una secuencia nucleotídica específica o cerca de la misma.

Una célula ha sido "transformada" por ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ADN ha sido introducido en la célula. El ADN transformante puede o no estar integrado (unido por enlace covalente) en el ADN cromosómico construyendo el genoma de la célula. En los procariotas, levaduras y células de mamífero, por ejemplo, el ADN transformante puede mantenerse en un elemento episómico tal como un plásmido. Con respecto a las células eucarióticas, una célula transformada estable es aquella en la que el ADN transformante se ha integrado en un cromosoma de modo que es heredado por las células hijas a través de la replicación cromosómica. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariótica para crear estirpes celulares o clones compuestos de una población de células hijas que contienen el ADN transformante. Un "clon" es una población de células procedentes de una sola célula o antecesor común por mitosis. Una "estirpe celular" es un clon de una célula primaria que es capaz de crecimiento estable *in vitro* durante muchas generaciones.

Dos secuencias de ADN son "sustancialmente homólogas" cuando por lo menos aproximadamente el 75% (preferentemente por lo menos aproximadamente el 80%, y aún más preferentemente por lo menos aproximadamente el 90 o el 95%) de los nucleótidos son iguales en toda la longitud definida de las secuencias de ADN. Las secuencias que son sustancialmente homólogas pueden identificarse comparando las secuencias que utilizan un programa informático típico disponible en los bancos de datos de secuencia, o en el experimento de hibridación de Southern en condiciones, por ejemplo, severas definidas para este sistema concreto. Definir las condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la experiencia en la materia. Véase, por ejemplo, Maniatis *et al.*, *supra*; DNA Cloning, Vols. I y II, *supra*; Nucleic Acid Hybridization, *supra*.

Una secuencia de ADN está "operativamente ligada" a una secuencia de control de expresión cuando la secuencia de control de expresión controla y regula la transcripción y traducción de esta secuencia de ADN. La expresión

“operativamente ligada” incluye las que tienen una señal de partida apropiada (p. ej., ATG) frente a la secuencia de ADN que se ha de expresar y que mantienen el marco de lectura correcto para permitir la expresión de la secuencia de ADN bajo el control de la secuencia de control de expresión y la producción del producto deseado codificado por la secuencia de ADN. Si un gen que se desea insertar en una molécula de ADN recombinante no contiene una señal de

La expresión “condiciones normales de hibridación” se refiere a las condiciones salinas y de temperatura sustancialmente equivalentes a $5 \times \text{SSC}$ y 65°C tanto para la hibridación como para el lavado. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que dichas “condiciones normales de hibridación” dependen de condiciones específicas incluyendo la concentración de sodio y magnesio en el tampón, la longitud y concentración de la secuencia nucleotídica, del porcentaje de incompatibilidad, del porcentaje de formamida y similares. Es también importante en la determinación de las “condiciones normales de hibridación” si las dos secuencias que se hibridan son ARN-ARN, ADN-ADN o ARN-ADN. Tales condiciones normales de hibridación son determinadas fácilmente por un experto en la materia según las fórmulas bien conocidas, en las que la hibridación está comprendida típicamente de 10 a 20°C por debajo de la T_m prevista o determinada con lavados de mayor severidad, si se desea.

“Degeneran en” significa que un codón de tres letras diferentes se utiliza para especificar un aminoácido concreto. Es bien sabido en la técnica que pueden utilizarse los codones siguientes indistintamente para codificar cada aminoácido específico:

Fenilalanina (Phe o F)	UUU o UUC
Leucina (Leu o L)	UUA o UUG o CUU o CUC o CUA o CUG
Isoleucina (Ile o I)	AUU o AUC o AUA
Metionina (Met o M)	AUG
Valina (Val o V)	GUU o GUC o GUA o GUG
Serina (Ser o S)	UCU o UCC o UCA o UCG o AGU o AGC
Prolina (Pro o P)	CCU o CCC o CCA o CCG
Treonina (Thr o T)	ACU o ACC o ACA o ACG
Alanina (Ala o A)	GCU o GCG o GCA o GCG
Tirosina (Tyr o Y)	UAU o UAC
Histidina (His o H)	CAU o CAC
Glutamina (Gln o Q)	CAA o CAG
Asparagina (Asn o N)	AAU o AAC
Lisina (Lys o K)	AAA o AAG
Ácido aspártico (Asp o D)	GAU o GAC
Ácido glutámico (Glu o E)	GAA o GAG
Cisteína (Cys o C)	UGU o UGC
Arginina (Arg o R)	CGU o CGC o CGA o CGG o AGA o AGG
Glicina (Gly o G)	GGU o GGC o GGA o GGG
Triptófano (Trp o W)	UGG
Codón de terminación	UAA (ocre) o UAG (ámbar) o UGA (ópalo)

Se entiende que los codones especificados anteriormente son para las secuencias del ARN. Los codones correspondientes para el ADN tienen la U sustituida por T.

Pueden realizarse mutaciones en la SEC. ID. nº: 1, de modo que un codón específico se cambie por un codón que codifica un aminoácido diferente. Dicha mutación se realiza generalmente haciendo los menores cambios posibles de nucleótido. Una mutación de sustitución de esta clase puede realizarse para cambiar un aminoácido en la proteína resultante de manera no conservadora (es decir, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o característica específicos para un aminoácido que pertenece a otro grupo) o de manera no conservadora (es decir, cambiando el codón de un aminoácido que pertenece a un grupo de aminoácidos que tiene un tamaño o característica específicos para un aminoácido que pertenece al mismo grupo). Dicho cambio conservador conduce generalmente a menos cambio en la estructura y función de la proteína resultante. Un cambio no conservador es más probable que altere la estructura, actividad o función de la proteína resultante. La presente invención debe considerarse que incluye secuencias que contienen cambios conservadores que no alteran significativamente la actividad o características de unión de la proteína resultante.

Dos secuencias de aminoácidos son “sustancialmente homólogas” cuando por lo menos aproximadamente el 70% de los restos de aminoácidos (preferentemente por lo menos aproximadamente el 80%, y aún más preferentemente por lo menos aproximadamente el 90 ó 95%) son idénticos o representan sustituciones conservadoras.

Una zona “heteróloga” del montaje de ADN es un segmento identificable de ADN en una molécula de ADN mayor que no se encuentra en asociación con la molécula mayor en la naturaleza. De este modo, cuando la zona heteróloga

codifica un gen de mamífero, el gen normalmente estará flanqueado por el ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo original. Otro ejemplo de una secuencia de codificación heteróloga es un montaje en el que la propia secuencia de codificación no se encuentra en la naturaleza (p. ej., un ADNc en el que la secuencia de codificación genómica contiene intrones, o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen natural). Las variaciones alélicas o los episodios de mutaciones naturales no dan lugar a una zona heteróloga de ADN como se define en la presente memoria.

Una secuencia de ADN está “operativamente ligada” a una secuencia de control de la expresión cuando la secuencia de control de expresión controla y regula la transcripción y traducción de esta secuencia de ADN. La expresión “operativamente ligada” incluye la que tiene una señal de iniciación apropiada (p. ej., ATG) enfrente de la secuencia de ADN que debe expresarse y que mantiene el marco de lectura correcto que permite la expresión de la secuencia de ADN bajo el control de la secuencia de control de la expresión y la producción del producto deseado codificado por la secuencia de ADN. Si un gen que se desea insertar en una molécula de ADN recombinante no contiene una señal de iniciación apropiada, dicha señal de iniciación puede insertarse enfrente del gen.

Además la presente invención también proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente. El activador puede ser, o es idéntico a un activador bacteriano, de levadura, de insecto o de mamífero. Además, el vector puede ser un plásmido, cósmido, cromosoma artificial de levadura (YAC), ADN vírico de bacteriófago o eucariótico. Pueden emplearse otros numerosos ejes centrales de vector conocidos en la materia como útiles para expresar proteínas. Dichos vectores incluyen, adenovirus, virus 40 de simio (SV40), citomegalovirus (CMV), virus del tumor de mama de ratón (MMTV), virus de leucemia murina de Moloney, sistemas de administración de ADN, es decir liposomas, y sistemas de administración de plásmido de expresión. Dichos vectores pueden adquirirse en el comercio o montarse a partir de las secuencias descritas por procedimientos bien conocidos en la técnica.

La presente invención también proporciona un sistema vector huésped para la producción de un polipéptido que comprende el vector de una célula huésped adecuada. Una amplia variedad de células huésped unicelulares son también útiles para expresar las secuencias de ADN de la presente invención. Estos huéspedes pueden incluir huéspedes eucarióticos y procarióticos bien conocidos tales como las cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, hongos tales como levaduras, y células de animal, tales como las células CHO, R1.1, B-W y L-M, células de riñón de mono verde africano (p. ej., COS 1, COS 7, BSC 1, BSC40 y BMT10), células de insecto (p. ej., Sf9) y células humanas y células vegetales en cultivo tisular.

Puede emplearse una amplia variedad de combinaciones de huésped/vector de expresión para expresar las secuencias de ADN de la presente invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, pueden estar constituidos por segmentos de secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Los vectores adecuados incluyen derivados de SV40 y plásmidos bacterianos conocidos, p. ej., plásmidos de *E. coli* col E1, pCR1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos tal como RP4; los ADN de fago, p. ej., los numerosos derivados del fago λ , M13 y ADN del fago monocaténario filamentosos; plásmidos de levaduras tal como el plásmido 2 μ o derivados del mismo; vectores útiles en células eucarióticas tales como los vectores útiles en células de insecto o de mamífero; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y los ADN del fago, tales como los plásmidos que han sido modificados para emplear el ADN del fago u otras secuencias de control de expresión, y similares.

Cualquiera de entre una amplia variedad de secuencias de control de expresión (secuencias que controlan la expresión de una secuencia de ADN operativamente unida a éste) pueden utilizarse en estos vectores para expresar las secuencias de ADN de la presente invención. Dichas secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los activadores precoz o tardío de SV40, CMV, vacunas, poliomas o adenovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema *TAC*, el sistema *TRC*, el sistema *LTR*, el operador principal y las zonas activadoras del fago λ , las zonas de control de la proteína de la cubierta fd, el activador de 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, los activadores de la fosfatasa ácida (p. ej., Pho5), los activadores de los factores de apareamiento α de la levadura, y otras secuencias conocidas para controlar la expresión de los genes de células procarióticas o eucarióticas o sus virus, y varias combinaciones de los mismos.

Se entiende que no todos los vectores, secuencias de control de expresión y huéspedes funcionarán igualmente bien para expresar las secuencias de ADN de la presente invención. Ni todos los huéspedes funcionarán igualmente bien con el mismo sistema de expresión. Sin embargo, un experto en la materia podrá seleccionar los vectores, secuencias de control de expresión y huéspedes apropiados sin excesiva experimentación para llevar a cabo la expresión deseada sin apartarse del alcance de la presente invención. Por ejemplo, al seleccionar un vector, debe considerarse el huésped porque el vector debe funcionar en éste. El número de copias del vector, la capacidad para controlar el número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores de antibióticos, también se considerarán.

Al seleccionar una secuencia de control de expresión, se considerará normalmente una variedad de factores. Éstos incluyen, por ejemplo, la resistencia relativa del sistema, su controlabilidad y su compatibilidad con la secuencia de ADN específica o el gen que debe expresarse, particularmente con respecto a las estructuras secundarias potenciales. Los huéspedes unicelulares adecuados se seleccionarán por consideración de p. ej., su compatibilidad con el vector seleccionado, sus características de secreción, su capacidad para plegar correctamente proteínas y sus requisitos de fermentación, así como la toxicidad para el huésped del producto codificado por las secuencias de ADN que deben expresarse y la facilidad de purificación de los productos de expresión.

Se describe también un procedimiento de producción de un polipéptido que comprende cultivar el sistema de vector huésped descrito anteriormente en condiciones adecuadas que permitan la producción del polipéptido y la recuperación del polipéptido producido de este modo.

- 5 Tal como se utiliza en la presente memoria, “pg” significa picogramo, “ng” significa nanogramo, “ug” o “ μg ” significan microgramo, “mg” significa miligramo, “ul” o “ μl ” significa microlitro, “ml” significa mililitro y “l” significa litro.

- 10 Se describe además la preparación de oligonucleótidos complementarios y ribozimas que pueden utilizarse para interferir con la expresión de una o más proteínas Ema a nivel de traducción. Este procedimiento utiliza ácido nucleico complementario y ribozimas para bloquear la traducción de un ARNm específico, ya sea enmascarando este ARNm con un ácido nucleico complementario o escindiéndolo con una ribozima.

- 15 Los ácidos nucleicos complementarios son moléculas de ADN o ARN que son complementarias con por lo menos una parte de una molécula de ARNm específica. (Véase Weintraub, 1990; Marcus-Sekura, 1988). En la célula, se hibridan al ARNm, formando una molécula de doble cadena. La célula no traduce un ARNm en esta forma de doble cadena. Por consiguiente, los ácidos nucleicos complementarios interfieren con la expresión de ARNm en la proteína. Los oligómeros de aproximadamente quince nucleótidos y moléculas que se hibridan con el codón de iniciación AUG serán particularmente eficaces, ya que son fáciles de sintetizar y probablemente plantean menos problemas que las moléculas mayores cuando las introducen en las células productoras de Ema. Se han utilizado procedimientos complementarios para inhibir la expresión de muchos genes *in vitro* (Marcus-Sekura, 1988; Hambor *et al.*, 1988).

- 20 Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otras moléculas de ARN de una sola cadena de manera algo análoga a las endonucleasas de restricción del ADN. Las ribozimas se descubrieron a partir de la observación de que determinados ARNm tienen la capacidad de escindir sus propios intrones. Modificando la secuencia de nucleótidos de estos ARN, los investigadores han sido capaces de modificar moléculas que reconocen secuencias nucleotídicas específicas en una molécula de ARN y escindirla (Cech, 1988). Debido a que son específicos para la secuencia, solamente se inactivan los ARNm con secuencias específicas.

- 30 Los investigadores han identificado dos tipos de ribozimas, el tipo *Tetrahymena* y el tipo “cabeza de martillo”. (Hasselhoff y Gerlach, 1988). Las ribozimas de tipo *Tetrahymena* reconocen secuencias de cuatro bases, mientras que las de tipo “cabeza de martillo” reconocen secuencias de once a dieciocho bases. Cuanto mayor sea la secuencia de reconocimiento más probablemente ocurrirá exclusivamente en las especies de ARNm diana. Por consiguiente, las ribozimas de tipo cabeza de martillo son preferibles a las ribozimas de tipo *Tetrahymena* para inactivar una especie de ARNm específico, y las secuencias de reconocimiento de dieciocho bases son preferibles a las secuencias de reconocimiento más cortas.

Anticuerpos

- 40 La presente invención proporciona además un anticuerpo capaz de reconocer o unir específicamente al polipéptido Ema aislado de la presente invención. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. Además, el anticuerpo puede estar marcado con un marcador detectable que es un marcador radioactivo, calorimétrico, fluorescente o luminiscente. El anticuerpo marcado puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. En una forma de realización, el anticuerpo marcado es un anticuerpo marcado purificado. Los procedimientos de marcado de anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo purificado contra un polipéptido Ema bacteriano, particularmente un polipéptido EmaA estreptocócico.

- 50 Los anticuerpos contra los polipéptidos aislados de la presente invención incluyen anticuerpos surgidos de manera natural y preparados de manera recombinante. Éstos pueden incluir tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales preparados por técnicas genéticas conocidas, así como anticuerpos biespecíficos (híbridos) y anticuerpos que incluyen otras funcionalidades que les aconsejan para su utilización en diagnóstico. Dichos anticuerpos pueden utilizarse en inmunoanálisis para diagnosticar infección con una cepa específica o especies de bacterias. Los anticuerpos pueden también utilizarse para la inmunización pasiva para tratar una infección por bacterias de estreptococos del Grupo B. Estos anticuerpos pueden también ser adecuados para modular la adherencia y/o invasión bacterianas incluyendo la actuación como agentes competitivos.

- 60 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal contra un polipéptido EmaA de estreptococos del Grupo B.

- 65 Se proporciona además un anticuerpo contra un polipéptido Ema, EmaA, marcado con un marcador detectable. El marcador puede seleccionarse de entre el grupo constituido por un enzima, un producto químico que emite fluorescencia y un elemento radioactivo.

El término “anticuerpo” incluye, a título de ejemplo, tanto los anticuerpos naturales como los no naturales. Específicamente, el término “anticuerpo” incluye anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de los mismos.

Además, el término “anticuerpo” incluye los anticuerpos híbridos y los anticuerpos sintéticos completos, y fragmentos de los mismos. Tales anticuerpos incluyen los policlonales, monoclonales, híbridos, de una sola cadena, los fragmentos Fab y un banco de expresión de Fab.

Un “anticuerpo” es cualquier inmunoglobulina, incluyendo los anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se unen a un epítipo específico. El término comprende anticuerpos policlonales, monoclonales e híbridos, los últimos mencionados descritos con mayor detalle en las patentes US nº 4.816.397 y nº 4.816.567.

Una “zona de combinación de anticuerpo” es la parte estructural de una molécula de anticuerpo compuesta por una cadena pesada y ligera variable y zonas hipervariables que se unen específicamente al antígeno.

La frase “molécula de anticuerpo” en sus varias formas gramaticales utilizadas en la presente memoria contempla tanto una molécula de inmunoglobulina intacta como una parte inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina.

Las moléculas de anticuerpo a título de ejemplo son moléculas de inmunoglobulina intactas, las moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y las fracciones de una molécula de inmunoglobulina que contiene el parátipo, incluyendo las fracciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v), cuyas fracciones se prefieren para su utilización en los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria.

Las fracciones Fab y F(ab')₂ de moléculas de anticuerpo se preparan mediante la reacción proteolítica de papaína y pepsina, respectivamente, en moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas por procedimientos que son bien conocidos. Véase, por ejemplo, la patente US nº 4.342.566 de Theofilopoulos *et al.* Las fracciones Fab' de la molécula de anticuerpo son también bien conocidas y se producen a partir de fracciones F(ab')₂ seguido de reducción de los enlaces disulfuros que unen las dos fracciones de cadena pesada como con mercaptoetanol, y seguido de alquilación del mercaptano de la proteína resultante con un reactivo tal como yodoacetamida. En la presente memoria se prefiere un anticuerpo que contenga moléculas de anticuerpo intactas.

La frase “anticuerpo monoclonal” en sus varias formas gramaticales se refiere a un anticuerpo que tiene solamente una especie de zona de combinación del anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un antígeno específico. Un anticuerpo monoclonal por lo tanto presenta típicamente una sola afinidad de unión para cualquier anticuerpo con el que inmunorreaccione. Un anticuerpo monoclonal puede contener por lo tanto una molécula de anticuerpo que tenga varias zonas de combinación del anticuerpo, cada una inmuno-específica para un antígeno diferente; p. ej., un anticuerpo monoclonal (híbrido) biespecífico.

Varios procedimientos conocidos en la técnica pueden utilizarse para la producción de anticuerpos policlonales contra el polipéptido o derivados o análogos del mismo (véase, p. ej., *Antibodies - A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nueva York, 1988). Para la producción del anticuerpo, pueden inmunizarse varios animales huéspedes por inyección con el polipéptido Ema de estreptococos del Grupo B, un fragmento de inmunógeno del mismo, o un derivado (p. ej., fragmento o proteína de fusión) del mismo, incluyendo pero sin limitarse a conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. El polipéptido puede estar conjugado con un portador inmunógeno, p. ej., albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH). Pueden utilizarse varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie del huésped.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, o fragmento, análogo o derivado del mismo, puede utilizarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por estirpes celulares continuas en el cultivo (véase, p. ej., *Antibodies - A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nueva York, 1988). Éstas incluyen pero no se limitan a la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), así como la técnica de trioma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72), y la técnica de EBV-hibridoma para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Los anticuerpos monoclonales pueden producirse en animales exentos de gérmenes que utilizan tecnología reciente (PCT/US90/02545). Los anticuerpos humanos pueden utilizarse y pueden obtenerse utilizando hibridomas humanos (Cote *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:2026-2030) o transformando linfocitos B humanos con virus EBV *in vitro* (Cole *et al.*, 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, págs. 77-96). De hecho, pueden utilizarse las técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos híbridos” (Morrison *et al.*, 1984, *J. Bacteriol.* 159:870; Neuberger *et al.*, 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda *et al.*, 1985, *Nature* 314:452-454) cortando y empalmado los genes de una molécula de anticuerpo de ratón específica para un polipéptido junto con los genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada. Dichos anticuerpos híbridos humanos o humanizados se prefieren para su utilización en la terapia de infecciones o enfermedades humanas, ya que los anticuerpos humanos o humanizados tienen menos probabilidades que los anticuerpos xenogénicos para provocar una respuesta inmunitaria, en particular una respuesta alérgica, ellos mismos. Se utilizan las técnicas descritas para la construcción de bancos de expresión de Fab (Huse *et al.*, 1989 *Science* 246:1275-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos de Fab monoclonales con la especificidad deseada para el polipéptido, o sus derivados, o análogos.

Los fragmentos de anticuerpo que contienen el idiotipo de la molécula de anticuerpo pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen pero no se limitan a: el fragmento F(ab')₂ que puede producirse

por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que pueden generarse produciendo los puentes disulfuro del fragmento F(ab')₂ y los fragmentos Fab que pueden generarse tratando la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor.

5 En la producción de anticuerpos, la identificación del anticuerpo deseado puede realizarse por técnicas conocidas en la materia, p. ej., radioinmunoanálisis, ELISA (ensayo inmunsorbente con enzima ligada), inmunoanálisis en “sándwich”, análisis inmunoradiométrico, reacciones de precipitina con difusión en gel, análisis de inmunodifusión, inmunoanálisis *in situ* (utilizando oro coloidal, enzima o marcadores de radioisótopo, por ejemplo), transferencias Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (p. ej., ensayos de aglutinación en gel, ensayos de he-

10 moaglutinación), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc.

La unión del anticuerpo se detecta por detección de un marcador en el anticuerpo primario. En otro procedimiento, el anticuerpo primario se detecta por detección de la unión de un anticuerpo secundario o reactivo con el anticuerpo

15 primario. En un procedimiento adicional, se marca el anticuerpo secundario. Se conocen muchos medios en la técnica para detectar la unión en un inmunoanálisis.

Los anticuerpos pueden marcarse para la detección *in vitro*, p. ej., con marcadores tales como enzimas, fluoróforos, cromóforos, radioisótopos, colorantes, oro coloidal, partículas de látex y agentes quimioluminiscentes. Alternativa-

20 mente, los anticuerpos pueden marcarse para la detección *in vivo*, p. ej., con radioisótopos (preferentemente tecnecio o yodo); reactivos de desplazamiento de resonancia magnética (tales como gadolinio y manganeso); o reactivos opacos al radio.

Los marcadores empleados más frecuentemente para estos estudios son los elementos radioactivos, enzimas, pro-

25 ductos químicos que emiten fluorescencia cuando se exponen a la luz ultravioleta y otros. Se conocen numerosos materiales fluorescentes y pueden utilizarse como marcadores. Éstos incluyen, por ejemplo, fluoresceína, rodamina, auramina, rojo de Texas, azul AMCA y amarillo Lucifer. Un material de detección específico es un anticuerpo anti-conejo preparado en cabras y conjugado con fluoresceína mediante un isotiocianato. El polipéptido puede también marcarse con un elemento radioactivo o con una enzima. El marcador radioactivo puede ser detectado por cualquiera

30 de los procedimientos de recuento disponibles actualmente. El isótopo preferido puede seleccionarse de entre ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I y ¹⁸⁶Re.

Los marcadores enzimáticos son asimismo útiles, y pueden detectarse por cualquiera de las técnicas calorimétrica, espectrofotométrica, fluoroespectrofotométrica, amperométrica o gasométrica actualmente utilizadas. La enzima se

35 conjuga con la partícula seleccionada por reacción con moléculas enlazadoras tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído y similares. Muchas enzimas que pueden utilizarse en estos procedimientos son conocidas y pueden utilizarse. Las preferidas son peroxidasa, β-glucuronidasa, β-D-glucuronidasa, β-D-glucosidasa, β-D-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa más peroxidasa y fosfatasa alcalina. Las patentes US n° 3.654.090; n° 3.850.752 y n° 4.016.043 son mencionadas a título de ejemplo para su exposición del material y procedimientos de marcado alternativos.

40 *Aplicaciones para diagnóstico*

La presente invención se refiere asimismo a las aplicaciones para diagnóstico, incluyendo los procedimientos para la identificación de infecciones por estreptococos.

45 Como se describió con detalle anteriormente, puede(n) producirse el/los anticuerpo(s) contra los polipéptidos Ema o fragmentos de los mismos o aislarse por procedimientos normalizados incluyendo las técnicas de hibridoma bien conocidas. Por conveniencia, el/los anticuerpo(s) contra los polipéptidos Ema se denominará(n) en la presente memoria Ab₁ y anticuerpo(s) surgidos en otras especies como Ab₂.

50 La presencia de estreptococos en células puede determinarse por los procedimientos inmunológicos habituales aplicables a dichas determinaciones. Se conocen numerosos procedimientos útiles. Los procedimientos que son especialmente útiles utilizan los polipéptidos Ema marcados con un marcador detectable, anticuerpo contra los polipéptidos Ema marcados con un marcador detectable o anticuerpo secundario marcado con un marcador detectable.

55 Los procedimientos y su aplicación son en su totalidad conocidos por los expertos en la materia. El procedimiento “competitivo”, se describe en las patentes US n° 3.654.090 y n° 3.850.752. El procedimiento en “sándwich”, se describe en las patentes US n° RE 31.006 y n° 4.016.043. Incluso se conocen otros procedimientos tales como los procedimientos de “doble anticuerpo” o “DASP”.

60 En cada caso, los polipéptidos Ema forman complejos con uno o más anticuerpo(s) o acompañantes de unión y un elemento del complejo está marcado con un marcador detectable. El hecho de que se haya formado un complejo y, si se desea, la cantidad del mismo, puede determinarse por procedimientos conocidos aplicables a la detección de marcadores.

65 Los kits de ensayo comerciales adecuados para su utilización por un médico especialista pueden prepararse para determinar la presencia o ausencia de estreptococos, particularmente del polipéptido EmaA que expresa estreptococos.

En la misma medida que el locus *ema*, como se describe en la presente memoria, se encuentra en el ADN genómico de muchos, si no en todos, los serotipos de los estreptococos del Grupo B, es un marcador general útil para estreptococos del Grupo B. En la medida que los homólogos de Ema existen en otra especie de estreptococos, incluyendo el grupo A y *S. pneumoniae*, es un marcador general útil para estreptococos. Por consiguiente, pueden producirse los kits de ensayo comerciales para determinar la presencia o ausencia de estreptococos, y por esta razón determinar si un individuo está infectado con estreptococos.

Asimismo se describe un sistema analítico para la identificación de potenciales compuestos eficaces para modular la actividad de una proteína Ema bacteriana de la presente invención. En un caso, el compuesto de ensayo, o un extracto que contiene el compuesto, podría administrarse a una muestra celular que exprese la proteína Ema específica para determinar el efecto del compuesto sobre la actividad de la proteína por comparación con una referencia. En un caso adicional, el compuesto de ensayo, o un extracto que contiene el compuesto, podría administrarse a una muestra celular que exprese la proteína Ema para determinar el efecto del compuesto sobre la actividad de la proteína, y por esta razón sobre la adherencia de dicha muestra celular a las células huésped, en comparación con una referencia.

Puede prepararse un sistema analítico para identificar potenciales fármacos eficaces para modular la actividad del polipéptido Ema. El polipéptido Ema puede introducirse en un sistema de ensayo, y el fármaco en estudio puede introducirse también en el cultivo celular resultante, y el cultivo ser examinado después para observar cualquier cambio en la actividad del polipéptido Ema de las células, debida a la adición del fármaco en estudio solo, o debida al efecto de cantidades añadidas del polipéptido Ema conocido.

Aplicaciones terapéuticas

Las posibilidades terapéuticas que surgen por la existencia de los polipéptidos Ema de estreptococos del Grupo B EmaA, EmaB, EmaC, EmaD y EmaE proceden del hecho de que los polipéptidos Ema se encuentran generalmente en varios serotipos de estreptococos del Grupo B. Además, las amplias posibilidades terapéuticas que surgen por la existencia de polipéptidos homólogos de Ema en varias especies de estreptococos distintas, incluyendo *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. Además los polipéptidos homólogos Ema han sido identificados en *E. faecalis* y *C. diphtheriae*. De particular relevancia a su idoneidad en la terapia de vacunas e inmunológica es que los polipéptidos EmaA, EmaB y EmaC poseen secuencias N-terminales coherentes con un péptido señal, lo que indica la secreción de la célula bacteriana y por lo menos la localización extracelular parcial. Además, los polipéptidos EmaA, EmaB, EmaC, EmaD y EmaE demuestran homología con distintas proteínas bacterianas involucradas o implicadas en la adherencia e invasión bacterianas. Por lo tanto, se prevé que los polipéptidos Ema están implicados en la adherencia a estreptococos o requeridos por la misma y/o en la invasión de células, crítica para la supervivencia bacteriana y la virulencia en el huésped humano.

Moduladores de la proteína adhesina de la matriz extracelular

Por lo tanto, en los casos en los que se desee reducir o inhibir los efectos resultantes de la proteína Ema adhesina de la matriz extracelular de la presente invención, podría introducirse un inhibidor apropiado de EmaA para bloquear su actividad.

En la presente memoria se describen tamices para un modulador de un polipéptido Ema, en particular que modula la adherencia o invasión facilitadas por EmaA.

En dicho ejemplo, un vector de expresión que contiene el polipéptido Ema de la presente invención, o un derivado o análogo del mismo, se coloca en una célula en presencia de por lo menos un agente que se supone que presenta actividad del modulador del polipéptido Ema. La célula es preferentemente una célula bacteriana, aun más preferentemente una célula de estreptococo o una célula huésped bacteriana. La cantidad de actividad de adherencia o de unión se determina y se identifica cualquiera de dichos agentes como modulador cuando la cantidad de actividad de adherencia o de unión en presencia de dicho agente es diferente que en su ausencia. Los vectores pueden introducirse por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. En un ejemplo citado, el polipéptido Ema de GBS se expresa en estreptococos y la etapa de determinación de la cantidad de actividad de adherencia o de unión se lleva a cabo determinando la cantidad de unión a células huésped bacterianas *in vitro*.

Cuando la cantidad de actividad de adherencia o de unión en presencia del modulador es mayor que en su ausencia, el modulador se identifica como agonista o activador del polipéptido Ema, mientras que cuando la cantidad de actividad de unión por adherencia en presencia del modulador es menor que en su ausencia, el modulador se identifica como agonista o inhibidor del polipéptido Ema. Como reconocería cualquier experto en la materia, determinaciones tales como éstas y las siguientes podrían requerir alguna forma de análisis estadístico, que está comprendida dentro de la experiencia en la materia.

Los efectores naturales descubiertos en las células que expresan el polipéptido Ema pueden fraccionarse y analizarse utilizando análisis de efector estándar como se ejemplifica por ejemplo en la presente memoria. De este modo un agente que se identifica puede ser un modulador de adherencia o de unión natural. Alternativamente, los bancos de productos naturales pueden cribarse utilizando los ensayos descritos en la presente memoria para el cribado de dichos agentes.

Otro método utiliza bacteriófago recombinante para producir grandes bancos. Utilizando el “procedimiento del fago” [Scout y Smith, 1990, *Science* 249:386-390 (1990); Cwirla, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:6378-6382 (1990); Devlin *et al.*, *Science*, 249:404-406 (1990)], pueden construirse bancos muy grandes (10^6 a 10^8 entidades químicas). Incluso otro procedimiento utiliza principalmente procedimientos químicos, de los cuales el procedimiento de Geysen [Geysen *et al.*, *Molecular Immunology* 23:709-715 (1986); Geysen *et al.*, *J. Immunologic Method* 102:259-274 (1987)] y el procedimiento de Fodor *et al.* [*Science* 251:767-773 (1991)] son ejemplos. Furka *et al.* [14th Internacional Congress of Biochemistry, volumen 5, resumen FR:013 (1988); Furka, *Int. J. Peptide Protein Res.* 37:487-493 (1991)], Houghton [patente US nº 4.631.211, publicada en diciembre 1986] y Rutter *et al.* [patente US nº 5.010.175, publicada el 23 de abril de 1991] describen procedimientos para producir una mezcla de péptidos que pueden analizarse.

En otro ejemplo, bancos sintéticos [Needels *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10700-4 (1993); Ohlmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10922-10926 (1993); Lam *et al.*, publicación de patente internacional nº WO 92/00252; Kocis *et al.*, publicación de patente internacional nº WO 9428028, y similares pueden utilizarse para cribar dicho agente.

Se describen también antagonistas o agentes de bloqueo que incluyen fragmentos de péptidos, miméticos, una molécula de ácido nucleico, un ribozima, un polipéptido, una molécula pequeña, una molécula de carbohidrato, un monosacárido, un oligosacárido o un anticuerpo. Asimismo, se describen los agentes que bloquean o inhiben de manera competitiva la bacteria estreptocócica. Se describe un agente que comprende un compuesto inorgánico, una molécula de ácido nucleico, un oligonucleótido, un compuesto orgánico, un péptido, un compuesto peptidomimético o una proteína que inhibe el polipéptido.

Vacunas

En otro aspecto, la presente invención comprende las vacunas basadas en las proteínas Ema descritas en la presente memoria.

La inmunidad activa contra estreptococos puede provocarse por inmunización (vacunación) con una cantidad inmunógena del polipéptido, o derivado del péptido o fragmento del mismo, y un adyuvante, en el que el polipéptido, o el derivado antigénico o fragmento del mismo, es el componente antigénico de la vacuna. El polipéptido, o derivado antigénico o fragmento del mismo, puede ser un componente antigénico, en presencia de otros componentes antigénicos en una vacuna. Por ejemplo, el polipéptido de la presente invención puede combinarse con otros polipéptidos o poli/oligosacáridos estreptocócicos, o fragmentos inmunógenos de los mismos, incluyendo por ejemplo el polisacárido capsular de GBS, Spb1, Spb2, antígeno alfa de la proteína C, Rib, Lmb y C5a-asa en una vacuna multicomponente. Dicha vacuna multicomponente puede utilizarse para potenciar la respuesta inmunitaria, aun en los casos en los que el polipéptido de la presente invención provoca una respuesta sobre sí mismo. El polipéptido de la presente invención puede también combinarse con las vacunas existentes, vacunas bacterianas completas o a base de cápsula, solas o en combinación con otros polipéptidos de GBS, particularmente Spb1 y/o Spb2 y/o antígeno alfa de la proteína C y/o Rib para potenciar dichas vacunas existentes.

El término “adyuvante” se refiere a un compuesto o mezcla que potencia la respuesta inmunitaria contra un antígeno. Un adyuvante puede servir como medicamento de liberación retardada en el tejido que libera lentamente el antígeno y también como activador del sistema linfóide que potencia de manera no específica la respuesta inmunitaria (Hood *et al.*, *Immunology*, segunda ed., 1984, Benjamin/Cummings: Menlo Park, California, pág. 384). Con frecuencia, una prueba de provocación primaria con un antígeno solo, en ausencia de un adyuvante, no podrá provocar una respuesta inmunitaria humoral o celular. Los adyuvantes incluyen, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, aceite o emulsiones de hidrocarburos, hemocianina de la lapa californiana, dinitrofenol y adyuvante humano potencialmente útil tal como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Se utiliza un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Se describe asimismo una vacuna que comprende un mutante no adherente ni virulento, incluyendo los mutantes ema descritos en la presente memoria.

Medaglini *et al.* (Madaglini *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6868-6872) y Oggioni y Pozzi (Oggioni, M. R. y Pozzi, G. (1996) *Gene* 169:85-90) han descrito anteriormente la utilización de *Streptococcus gordonii*, una bacteria comensal de la cavidad oral humana, como vehículos de administración de vacuna activa y para la expresión génica heteróloga. Dicho mutante *ema* puede utilizarse por consiguiente como vehículo para la expresión de las proteínas inmunógenas con el fin de provocar una respuesta inmunitaria a tales otras proteínas en el contexto de las vacunas. Puede provocarse inmunidad activa contra estreptococos del Grupo B, por inmunización (vacunación) con una cantidad inmunógena del vehículo *ema* que expresa una proteína inmunógena. También se describe la utilización de dicho mutante *ema* en la expresión de una proteína terapéutica en el huésped en el contexto de otras formas de terapia.

El polipéptido de la presente invención, o fragmentos del mismo, pueden prepararse en una mezcla con un adyuvante para preparar una vacuna. El polipéptido o derivado del péptido o fragmento del mismo, utilizado como componente antigénico de la vacuna puede ser un antígeno común a todos o muchos serotipos de bacterias GBS, o común a especies de bacterias íntimamente relacionadas, por ejemplo *Streptococcus*.

Los vectores que contienen la vacuna a base de ácido nucleico de la invención pueden introducirse en el huésped deseado por procedimientos conocidos en la materia, p. ej., transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato cálcico, lipofección (fusión de lisosomas), utilización de una pistola génica, o un transportador del vector del ADN (véase, p. ej., Wu *et al.*, 1992, *J. Biol. Chem.* 267:963-967; Wu y Wu, 1988, *J. Biol. Chem.* 263:14621-14624; Harmut *et al.*, solicitud de patente canadiense n° 2.012.311, presentada el 15 de marzo de 1990).

Los modos de administración de la vacuna o composiciones de la presente invención pueden comprender la utilización de cualquier procedimiento adecuado y/o procedimientos para administrar la vacuna o composición al animal huésped por lo que son eficaces desde un punto de vista inmunoestimulante. Los modos de administración pueden incluir, sin limitación, procedimientos de administración parenteral tales como por vía paracanceral, transmucosal, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal e intratumoral. Ya que el resultado deseado de la vacunación consiste en interpretar una respuesta inmunitaria contra el antígeno, y de este modo contra el organismo patógeno, es deseable la administración directa, o por direccionamiento o selección de un vector vírico, indirectamente, a los tejidos linfoides, p. ej., ganglios linfáticos o bazo. Ya que las células inmunes se están replicando continuamente, son dianas ideales para las vacunas de ácido nucleico a base de vector retroviral, ya que los retrovirus requieren células replicadoras. Estas vacunas y composiciones pueden utilizarse para inmunizar mamíferos, por ejemplo, por las vías intramuscular o parenteral, o mediante la administración a las superficies de la mucosa utilizando micropartículas, cápsulas, liposomas y moléculas de direccionamiento, tales como toxinas y anticuerpos. Las vacunas y composiciones inmunógenas pueden administrarse a las superficies de la mucosa, por ejemplo, por las vías nasal u oral (intragástricas). Alternativamente, pueden ser deseables otros modos de administración incluyendo los supositorios. Para los supositorios, pueden incluirse aglutinantes y portadores, por ejemplo, polialquilenglicoles y triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir incipientes empleados normalmente tales como calidades farmacéuticas de sacarina, celulosa y carbonato de magnesio.

Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación lenta o polvos y contienen entre 1 y 95% de las composiciones inmunógenas. Las composiciones inmunógenas se administran de manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal para que sea terapéuticamente eficaz, protectora e inmunógena. La cantidad que debe administrarse depende del sujeto que debe inmunizarse, incluyendo, por ejemplo la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para sintetizar anticuerpos, y si se desea, para producir una respuesta inmunitaria mediada por células, humoral o por anticuerpo. Las cantidades exactas de antígeno y de composición inmunógena que deben administrarse dependen del criterio del médico de familia. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados son fácilmente determinables por expertos en la materia y pueden ser del orden de microgramos a miligramos. Los regímenes adecuados para la administración inicial y dosis de refuerzo son también variables, pero pueden incluir una administración inicial seguida de administración ulterior. La dosificación de la vacuna puede también depender de la vía de administración y variará según el tamaño del huésped.

Puede proporcionarse inmunidad pasiva a un sujeto animal susceptible de padecer una infección por estreptococos mediante administración de antisuero, anticuerpos policlonales o un anticuerpo monoclonal neutralizante contra el polipéptido Ema de la invención al paciente. Se describe una combinación de anticuerpos dirigida contra uno o más polipéptidos Ema EmaA, en combinación con uno o más anticuerpos contra Spb1, Spb2, Rib y antígeno alfa de la proteína C. Aunque la inmunidad pasiva no proporciona protección a largo plazo, puede ser una herramienta valiosa para el tratamiento de una infección bacteriana en un sujeto que no ha sido vacunado. La inmunidad pasiva es particularmente importante para el tratamiento de cepas de bacterias resistentes a antibióticos, ya que ninguna otra terapia puede estar disponible. Los anticuerpos administrados para la terapia inmunitaria pasiva pueden ser anticuerpos autólogos. Por ejemplo, si el paciente es un ser humano, los anticuerpos son de origen humano o han sido "humanizados", para minimizar la posibilidad de una respuesta inmunitaria contra los anticuerpos. Pueden utilizarse vacunas activas o pasivas para proteger a un paciente animal de la infección por estreptococos, particularmente estreptococos del Grupo B.

Se han generado y probado anteriormente vacunas contra GBS. Las vacunas preliminares utilizaron polisacárido no conjugado purificado. Los polisacáridos y oligosacáridos de GBS son poco inmunógenos y no pueden producir memoria ni respuestas de refuerzo significativas. Baker *et al.* inmunizaron 40 mujeres embarazadas con polisacárido capsular de serotipo III purificado (Baker, C. J. *et al.* (1998) *New Engl. J. of Med.* **319**:1180-1185). En conjunto, solamente el 57% de las mujeres con bajas concentraciones de anticuerpo específico respondieron a la vacuna. La escasa inmunogenicidad del antígeno polisacárido purificado se demostró más en un estudio en el que treinta voluntarios adultos se inmunizaron con una vacuna tetravalente compuesta por polisacárido purificado de los serotipos Ia, Ib, II y III (Kotloff, K. L. *et al.* (1996) *Vaccine* **14**:446-450). Aunque segura, esta vacuna fue solo modestamente inmunógena, respondiendo solamente el 13% de los pacientes al tipo Ib, el 17% al tipo II, respondiendo el 33% al tipo Ia y respondiendo el 70% al polisacárido de tipo III. La escasa inmunogenicidad de los antígenos de polisacárido incitó esfuerzos para desarrollar vacunas conjugadas de polisacárido, con lo cual estos polisacáridos u oligosacáridos se conjugan con portadores de proteína. El noventa por ciento de mujeres adultas sanas inmunizadas con una vacuna conjugada de polisacárido de tipo III-toxoide contra el tétanos respondió con un aumento cuádruple en la concentración de anticuerpo, en comparación con el 50% de las inmunizadas solo con polisacárido (Kasper, D. L. *et al.* (1996) *J. of Clin. Invest.* **98**:2308-2314). Una vacuna conjugada de polisacárido de tipo Ia/Ib y toxoide contra el tétanos fue igualmente más inmunógena en adultos sanos que solo el polisacárido (Baker, C. J. *et al.* (1999) *J. Infect. Dis.* **179**:142-150).

El procedimiento general para la conjugación del polisacárido se describe en Wessels *et al.* (Wessels, M. R. *et al.* (1990) *J. Clin. Investigation* **86**:1428-1433). Antes del acoplamiento con el toxoide contra el tétanos, se introducen grupos aldehído en el polisacárido por oxidación controlada con peryodato, dando como resultado la conversión de una parte de los restos de ácido siálico del polisacárido a restos del análogo en el carbono 8 del ácido siálico, ácido 5-acetamido-3,5-didesoxi-D-galactosilactosilósico. El toxoide contra el tétanos se conjuga con el polisacárido por aminación reductora utilizando grupos de aldehído libres presentes en los restos de ácido siálico parcialmente oxidados. La preparación y conjugación de oligosacáridos se describe en Paoletti *et al.* (Paoletti, L. C. *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:18278-18283). El polisacárido capsular purificado se despolimeriza mediante digestión enzimática utilizando endo-beta-galactosidasa producida por *Citrobacter freundii*. Después de la digestión, los oligosacáridos se fraccionan por cromatografía de filtración en gel. El toxoide contra el tétanos se acopló por enlaces covalentes mediante una molécula espaciadora sintética al extremo reductor del oligosacárido por aminación reductora.

Los procedimientos y las vacunas que comprenden vacunas de conjugado de GBS, que comprenden polisacárido capsular y proteína se proporcionan y se describen en las patentes US nº 5.993.825, nº 5.843.461, nº 5.795.580, nº 5.302.386 y nº 4.356.263.

Estas vacunas de conjugado incluyen las vacunas de conjugado polisacárido-toxoide contra el tétanos.

Un polipéptido propuesto para ser utilizado en una vacuna con GBS en el antígeno alfa de la proteína C de GBS repetitiva, que contiene hasta nueve unidades repetidas una tras de otra de 82 aminoácidos (Michel, J. K. *et al.* (1992) *PNAS USA* **89**: 10060-10064). El polipéptido, los procedimientos y las vacunas del mismo, incluyendo las vacunas del conjugado de polisacárido generadas con el mismo, se proporcionan y se describen en las patentes US nº 5.968.521, nº 5.908.629, nº 5.858.362, nº 5.847.081, nº 5.843.461, nº 5.843.444, nº 5.820.860 y 5.648.241.

Los anticuerpos generados contra el antígeno alfa con proteína C con un gran número de repeticiones protegen contra la infección, pero los GBS son capaces de cambiar la estructura de la proteína eliminando una o más de las zonas de repetición y la detección del escape por estos anticuerpos (Madoff, L. C. *et al.* (1996) *PNAS USA* **93**:4131-4136). Este efecto pudo evitarse teóricamente por inmunización con una proteína con un número inferior de unidades de repetición, pero la inmunogenicidad del antígeno alfa con la proteína C está inversamente relacionada con el número de repeticiones, el 65% de los ratones respondieron a la inmunización con la proteína de 9 repeticiones, pero solamente el 11% a una proteína con 1 repetición (Gravekamp, C. *et al.* (1997) *Infect Immunity* **65**:5216-5221). Esto es un inconveniente con cualquier proteína con una estructura repetitiva, es común para bacterias que son capaces de alterar o reclasificar estos genes para alterar las proteínas expuestas en su superficie.

Las dosis típicas para una vacuna compuesta de un antígeno de proteína están comprendidas en el intervalo entre 2,5 y 50 µg de proteína total por dosis. Las dosis típicas para una vacuna conjugada polisacárido-proteína son de 7,5 a 25 µg de polisacárido y de 1,25 a 250 µg de proteína portadora. Estos tipos de vacunas se administran casi siempre por vía intramuscular. Los programas de dosificación de una vacuna pueden ser determinados fácilmente por un especialista experto, particularmente por comparación de vacunas similares, incluyendo otras vacunas con GBS. Si se utiliza como vacuna universal, una vacuna con GBS se integraría en el programa de inmunización de rutina. Las vacunas más similares requieren una serie principal de inmunizaciones (normalmente 2 ó 3 dosis a intervalos de 2 meses empezando al mes o 2 meses de edad) y un único refuerzo a los 12 a 18 meses de edad. Un número más pequeño de dosis o una sola dosis puede ser adecuada en niños mayores (más de un año de edad). Para la inmunización de mujeres embarazadas, un programa de inmunización a título de ejemplo sería una sola dosis administrada en el segundo o al principio del tercer trimestre. Para la inmunización de mujeres adultas no embarazadas, se utilizaría probablemente una sola dosis. El requisito para las dosis de refuerzo posteriores en adultos es difícil de predecir, ésta se basaría en la inmunogenicidad de la vacuna y del seguimiento continuo de la eficacia de la vacuna.

Composiciones inmunógenas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunógena que comprende uno o más polipéptidos Ema bacterianos.

Composiciones farmacéuticas

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido Ema de estreptococos, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Dicha composición farmacéutica para prevenir la fijación de estreptococos a la superficie de la mucosa puede incluir anticuerpos EmaA contra el polipéptido Ema, o cualquier combinación de anticuerpos contra uno o más de dichos polipéptidos Ema. Además, alguna de dichas composiciones puede incluir además anticuerpo contra los polipéptidos de GBS Spb1, Spb2, antígeno alfa con proteína C o Rib. La adherencia de bloqueo que utiliza dicho anticuerpo bloquea la etapa inicial en la infección reduciendo de este modo la colonización. Ésta a su vez disminuye de una persona a otra la transmisión y evita el desarrollo de la enfermedad sintomática.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "composición farmacéutica" significa las cantidades terapéuticamente eficaces de productos de polipéptidos o anticuerpos de la invención junto con diluyentes, conservantes, disolventes, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores adecuados útiles en la terapia contra la infección bacteriana o para pro-

vocar una respuesta inmunitaria. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la cantidad que proporciona un efecto terapéutico para una enfermedad y un régimen de administración dados. Dichas composiciones son líquidas o liofilizadas o si no formulaciones secas e incluyen diluyentes de varios contenidos de tampón (p. ej., Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para prevenir la absorción a las superficies, detergentes (p. ej., Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), agentes disolventes (p. ej., glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfito sódico), conservantes (p. ej., Timerosal, alcohol bencílico, parabenos), sustancias de relleno o modificadores de tonicidad (p. ej., lactosa, manitol), enlace covalente de polímeros tal como polietilenglicol a la proteína, acomplejado con iones metálicos, o incorporación del material en o sobre preparaciones en partículas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilamelares o multilamelares, fantasmas de eritrocitos o esferoplastos. Dichas composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de eliminación *in vivo* de los polipéptidos de la presente invención. La selección de composiciones dependerá de las propiedades físicas y químicas del polipéptido. Las composiciones de liberación controlada o mantenida incluyen la formulación en productos de liberación lenta lipófilos (p. ej., ácidos grasos, ceras, aceites). También se describen composiciones en partículas recubiertas con polímeros (p. ej., poloxámeros o poloxaminas) y los polipéptidos de la presente invención acoplados a anticuerpos dirigidos contra receptores específicos para tejidos, ligandos o antígenos o acoplados a ligandos de receptores específicos para tejidos. Otros ejemplos de las composiciones incorporan formas en partículas, recubrimientos protectores, inhibidores de proteasa o potenciadores de permeación para varias vías de administración, incluyendo las vías parenteral, pulmonar, nasal y oral.

Además, tal como se utiliza en la presente memoria “portador farmacéuticamente aceptable” es bien conocido por los expertos en la materia e incluyen, tampón fosfato 0,01 a 0,1 M y preferentemente 0,05 M o solución salina al 0,8%. Además, dichos portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son el propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tal como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo la solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen la solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer lactada o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluido y de nutrientes, reponedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Pueden estar también presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes comparadores, gases inertes y similares.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción alérgica o desfavorable similar, tales como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano.

La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” utilizada en la presente memoria significa una cantidad suficiente para prevenir, y preferentemente reducir en por lo menos aproximadamente el 30 por ciento, más preferentemente por lo menos el 50 por ciento, aún más preferentemente el 90 por ciento, una infección clínicamente significativa por bacteria estreptocócica. Alternativamente, en el caso de una vacuna o composición inmunógena, una cantidad terapéuticamente eficaz utilizada en la presente memoria significa una cantidad suficiente y adecuada para provocar una respuesta inmunitaria y una respuesta al anticuerpo en un individuo, y particularmente para proporcionar una respuesta suficiente para prevenir, y preferentemente reducir en por lo menos aproximadamente el 30 por ciento, más preferentemente por lo menos el 50 por ciento, aún más preferentemente el 90 por ciento, una infección clínicamente significativa por bacteria estreptocócica.

Las composiciones de liberación controlada o mantenida incluyen la formulación en productos de liberación lenta lipófilos (p. ej., ácidos grasos, ceras, aceites). También se describen composiciones en partículas recubiertas con polímeros (p. ej., poloxámeros o poloxaminas) y los compuestos acoplados a anticuerpos dirigidos contra receptores específicos para tejidos, ligandos o antígenos o acoplados a ligandos de receptores específicos para tejidos. Otros ejemplos de las composiciones incorporan formas en partículas, recubrimientos protectores, inhibidores de proteasa o potenciadores de permeación para varias vías de administración, incluyendo las vías parenteral, pulmonar, nasal y oral.

Cuando se administran, los compuestos se eliminan con frecuencia rápidamente de las superficies de las mucosas o de la circulación y pueden por consiguiente producir actividad farmacológica de vida relativamente corta. En consecuencia, pueden requerirse administraciones frecuentes de dosis relativamente grandes de compuestos bioactivos para mantener la eficacia terapéutica. Los compuestos modificados por el enlace covalente de los polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona o poliprolina se conocen porque presentan vidas medias sustancialmente más largas en la sangre tras la inyección intravenosa que lo hacen los compuestos no modificados correspondientes (Abuchowski *et al.*, 1981; Newmark *et al.*, 1982; y Katre *et al.*, 1987). Dichas modificaciones pueden también aumentar la solubilidad de los compuestos en solución acuosa, eliminar la agregación, aumentar la estabilidad física y química del compuesto y reducir en gran medida la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. Como resultado, puede conseguirse la actividad biológica deseada *in vivo* mediante la administración de dichos aductos polímero-compuesto con menos frecuencia o en dosis menores que con el compuesto no modificado.

Dosis. La cantidad suficiente puede incluir pero no se limita a la comprendida aproximadamente entre 1 $\mu\text{g/kg}$ y aproximadamente 1.000 mg/kg. La cantidad puede ser de 10 mg/kg. La forma farmacéuticamente aceptable de la composición incluye un portador farmacéuticamente aceptable.

- 5 Los ejemplos anteriores proporcionan composiciones terapéuticas que comprenden composiciones farmacéuticas que comprenden vectores, vacunas, polipéptidos, ácidos nucleicos y anticuerpos, anti-anticuerpos y agentes, para competir con la bacteria de estreptococos del Grupo B por las actividades patógenas, tal como la adherencia a las células huésped.
- 10 La preparación de las composiciones terapéuticas que contienen un componente activo está bien comprendida en la materia. Típicamente, dichas composiciones se preparan en forma de aerosol del polipéptido administrado a la nasofaringe o como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección. La preparación puede estar también emulsionada. El ingrediente terapéutico activo se mezcla con frecuencia con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponación del pH que aumentan la eficacia del ingrediente activo.
- 15
- 20 Un componente activo puede formularse en la composición terapéutica en formas salinas neutralizadas farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido o de la molécula de anticuerpo) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas a partir de los grupos carboxilo libres pueden también proceder de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y de bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares.
- 25

Una composición que comprende "A" (en la que "A" es una sola proteína, molécula de ADN, vector, etc.) está sustancialmente exenta de "B" (en la que "B" comprende una o más proteínas contaminantes, moléculas de ADN, vectores, etc.) cuando por lo menos aproximadamente el 75% en peso de las proteínas, ADN, vectores (dependiendo de la categoría de especies a la que pertenecen A y B) en la composición es "A". Preferentemente, "A" comprende por lo menos aproximadamente el 90% en peso de la especie A+B en la composición, aún más preferentemente por lo menos aproximadamente el 99% en peso.

30

35 La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" utilizada en la presente memoria significa una cantidad suficiente para reducir por lo menos aproximadamente el 15 por ciento, preferentemente por lo menos el 50 por ciento, más preferentemente por lo menos el 90 por ciento y aún más preferentemente prevenir, una insuficiencia clínicamente significativa de la actividad, función y respuesta del huésped. Alternativamente, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para producir una mejora en una enfermedad clínicamente significativa en el huésped. Una insuficiencia en la respuesta del huésped se pone de manifiesto continuando o propagando la infección bacteriana. Una mejora en una enfermedad clínicamente significativa en el huésped incluye una disminución de la carga bacteriana, eliminación de bacterias de las células huésped colonizadas, reducción de la fiebre o de la inflamación asociadas con la infección, o una reducción de cualquier síntoma asociado a la infección bacteriana.

40

45 El componente o los componentes de una composición terapéutica puede introducirse por vía parenteral, a través de las mucosas, p. ej., por vía oral, nasal, pulmonar, o por vía rectal o transdérmica. Preferentemente, la administración es parenteral, p. ej., por inyección intravenosa, e incluyendo también, pero sin limitarse a, administración intraarterial, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. La administración oral o pulmonar puede resultar preferida para activar la inmunidad de la mucosa; dado que los estreptococos del Grupo B generalmente colonizan las mucosas nasofaríngea y pulmonar, particularmente la de los recién nacidos, la inmunidad de la mucosa puede ser un tratamiento preventivo particularmente eficaz. La expresión "dosis unitaria" cuando se utiliza en referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a las unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para seres humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado junto con el diluyente requerido; es decir, el portador o vehículo.

50

55

El compuesto activo puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat *et al.*, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, López-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); López-Berestein, *ibid*, págs. 317-327; generalmente *ibidem*).

60

La composición terapéutica puede administrarse en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el polipéptido puede administrarse utilizando infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. Puede utilizarse una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald *et al.*, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otro ejemplo, pueden utilizarse materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); véase también Levy *et al.*, *Science* 228:190 (1985); During *et al.*, *Ann. Neurol.* 25:351 (1989);

65

Howard *et al.*, *J. Neurosurg.* 71:105 (1989)). Incluso en otro ejemplo, un sistema de liberación controlada puede colocarse en la proximidad de la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis general (véase, p. ej., Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, anteriormente, vol. 2, págs. 115-138 (1984)). Un dispositivo de liberación controlada puede introducirse en un paciente en la proximidad del punto de activación inmunitaria apropiada o de un tumor. Otros sistemas de liberación controlada se exponen en el estudio de Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

Un paciente en el que la administración de un componente activo como se indicó anteriormente es un régimen terapéutico eficaz para una infección bacteriana es preferentemente un ser humano, pero puede ser cualquier animal. De este modo, como puede apreciar por cualquier experto en la materia, los procedimientos y composiciones farmacéuticas de la presente invención son particularmente adecuados para la administración a cualquier animal, particularmente un mamífero, e incluyendo, animales domésticos, tales como animales felinos o caninos, animales de granja, tales como de las especies bovina, equina, caprina, ovina y porcina, animales salvajes (ya sea en la naturaleza o en un zoológico), animales de investigación, tales como ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas, cerdos, perros, gatos, etc., es decir, para uso médico veterinario.

En los procedimientos y composiciones terapéuticos se proporciona una dosis terapéuticamente eficaz del componente activo. Una dosis terapéuticamente eficaz puede ser determinada por cualquier investigador médico experto basándose en las características del paciente (edad, peso, sexo, enfermedad, complicaciones, otras enfermedades, etc.), como es bien conocido en la materia. Además, a medida que se llevan a cabo más estudios rutinarios, aparecerá más información específica con respecto a los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento de varias enfermedades en varios pacientes, y cualquier investigador experto, considerando el contexto terapéutico, la edad y la salud general del receptor, es capaz de determinar la dosificación apropiada. Generalmente, para la inyección o infusión intravenosa, la dosis puede ser inferior que para la administración intraperitoneal, intramuscular u otra vía de administración. El programa de dosificación puede variar, dependiendo de la vida media en circulación y de la formulación utilizada. Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de la dosificación en la cantidad terapéuticamente eficaz. Las cantidades exactas de ingrediente activo requeridas para ser administradas dependen del criterio del médico de cabecera y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, las dosis adecuadas pueden estar comprendidas entre aproximadamente 0,1 y 20, preferentemente entre 0,5 y aproximadamente 10, y más preferentemente uno a varios, miligramos de ingrediente activo por kilogramo de peso corporal del individuo al día y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo son también variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas mediante una inyección u otra administración posteriores. Alternativamente, se contempla la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones de diez nanomolar a diez micromolar en la sangre.

Administración con otros compuestos. Para el tratamiento de una infección bacteriana, se puede administrar el presente componente activo junto con una o más composiciones farmacéuticas utilizadas para tratar la infección bacteriana, incluyendo

(1) antibióticos; (2) inhibidores de adhesina bacteriana solubles en carbohidratos; (3) otros inhibidores de adhesina bacteriana de molécula pequeña; (4) inhibidores del metabolismo, transporte o transformación bacterianos; (5) estimulantes de la lisis bacteriana, o (6) anticuerpos antibacterianos o vacunas dirigidas a otros antígenos bacterianos. Otros componentes activos potenciales incluyen agentes antiinflamatorios, tales como esteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos. La administración puede ser simultánea (por ejemplo, administración de una mezcla del presente componente activo y un antibiótico) o pueden ser en serie.

Así pues, las composiciones terapéuticas pueden incluir además una cantidad eficaz del componente activo y uno o más de los ingredientes activos siguientes: un antibiótico, un esteroide, etc.

Por lo tanto, en un caso específico en el que se desea reducir o inhibir la infección resultante de una unión mediada por la bacteria de la bacteria a una célula huésped, o de un anticuerpo a ésta, o de un ligando de la misma o de un anticuerpo a este ligando, el polipéptido se introduce para bloquear la interacción de la bacteria con la célula huésped.

Asimismo en la presente memoria se describe la administración pulmonar de un inhibidor del polipéptido de la presente invención que actúa como agente inhibidor de adhesina (o derivados del mismo). El agente inhibidor de adhesina (o el derivado) se administra a los pulmones de un mamífero, en los que puede interferir con bacterias, es decir, estreptococos, y preferentemente estreptococos del Grupo B que se unen a células huésped. Otros artículos de la preparación de proteínas para la administración pulmonar se encuentran en la técnica [Adjei *et al.* (1990) *Pharmaceutical Research*, 7:565-569; Adjei *et al.* (1990) *International Journal of Pharmaceutics*, 63:135-144 (acetato de leuprolida); Braquet *et al.* (1989), *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13(supl. 5):143-146 (endotelina-1); Hubbard *et al.* (1989) *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, págs. 206-212 (α 1-antitripsina); Smith *et al.* (1989) *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (α -1-proteinasa); Oswein *et al.*, "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, marzo, (1990) (hormona de crecimiento humano recombinante); Debs *et al.* (1988) *J. Immunol.* 140:3482-3488 (interferón- γ y factor alfa de la necrosis tumoral); Platz *et al.*, patente US nº 5.284.656 (factor estimulante de colonias de granulocitos)]. Un procedimiento y una composición para la administración pulmonar de fármacos se describe en la patente US nº 5.451.569, publicada el 19 de septiembre de 1995 concedida a Wong *et al.*

Todos los dispositivos citados requieren la utilización de formulaciones adecuadas para la administración del agente (o derivado) inhibidor de adhesina. Típicamente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede conllevar la utilización de un material propulsor adecuado, además de los diluyentes, adyuvante y/o portadores habituales útiles en la terapia. Asimismo, la utilización de liposomas, microcápsulas o microesferas, la inclusión de complejos, o de otros tipos de portadores se contempla. El agente inhibidor de adhesina químicamente modificado puede prepararse también en diferentes formulaciones dependiendo del tipo de modificación química o del tipo de dispositivo empleado.

Las formulaciones adecuadas para su utilización con un nebulizador, ya sea de chorro a presión o ultrasónico, comprenderán típicamente el agente (o derivado) inhibidor de adhesina disuelto en agua a una concentración de entre aproximadamente 0,1 y 25 mg del agente inhibidor de adhesina biológicamente activo por ml de solución. La formulación puede incluir también un tampón y un azúcar sencillo (p. ej., para la estabilización del agente inhibidor de adhesina y regulación de la presión osmótica). La formulación del nebulizador puede contener también un tensioactivo, para reducir o prevenir la agregación producida por la superficie del agente inhibidor de adhesina producida por atomización de la solución en la formación del aerosol.

Las formulaciones para su utilización con un dispositivo inhalador dosificador comprenderán generalmente un polvo finamente dividido que contiene el agente (o derivado) inhibidor de adhesina en suspensión en un propulsor con ayuda de un tensioactivo. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para este fin, tal como un clorofluorocarbonado, un hidroclorofluorocarbonado, un hidrofluorocarbonado o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen el trioleato de sorbitán y la lecitina de soja. El ácido oleico puede también ser útil como tensioactivo.

Las formulaciones líquidas de aerosol contienen agente inhibidor de adhesina y un agente dispersante en un diluyente fisiológicamente aceptable. Las formulaciones de aerosol en polvo seco están constituidas por una forma sólida finamente dividida de agente inhibidor de adhesina y agente dispersante. Ya sea con el líquido o con la formulación de aerosol en polvo seco, la formulación debe ser aerosolizada. Es decir, puede ser descompuesta en partículas líquidas o sólidas a fin de asegurar que la dosis aerosolizada alcanza realmente las membranas de la mucosa de las fosas nasales o del pulmón. La expresión "partícula de aerosol" se utiliza en la presente memoria para describir la partícula líquida o sólida adecuada para la administración nasal o pulmonar, es decir, que alcance las membranas mucosas. Otras consideraciones, tal como la construcción del dispositivo de administración, los componentes adicionales en la formulación y las características de la partícula son importantes. Estos aspectos de la administración pulmonar de un fármaco son bien conocidos en la materia, y la manipulación de las formulaciones, los procedimientos de aerosolización y la construcción de un dispositivo de administración requieren como máximo la experimentación de rutina por cualquier experto en la materia. En un ejemplo específico, el diámetro dinámico másico medio será de 5 micrómetros o menos con el fin de asegurar que las partículas de fármaco alcanzan los alvéolos pulmonares [Wearley, L. L. (1991) *Crit. Rev. In Ther. Drug Carrier Systems* 8:333].

Los sistemas de administración del aerosol, tales como el inhalador dosificador presurizado y el inhalador de polvo seco se dan a conocer en Newman, S. P., *Aerosols and the Lung*, Clarke, S. W. y Davia, D. editores, págs. 197-22 y pueden utilizarse a propósito de la presente invención.

Como se expuso con detalle anteriormente, una formulación de aerosol puede influir otros ingredientes terapéutica o farmacológicamente activos además del agente inhibidor de adhesina, tales como, pero sin limitarse un antibiótico, un esteroide, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, etc.

Formulaciones líquidas de aerosol. Asimismo se describen formulaciones y formas farmacéuticas de aerosol para su utilización en el tratamiento de pacientes que padecen enfermedades bacterianas, p. ej., por estreptococos, particularmente por infección por estreptococos. En general dichas formas farmacéuticas contienen agente inhibidor de adhesina en un diluyente farmacéuticamente aceptable. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a agua esterilizada, solución salina, solución salina tamponada, solución de dextrosa y similares. Un diluyente que puede utilizarse es la solución salina tamponada con fosfato, o una solución salina tamponada comprendida generalmente en el intervalo de pH entre 7,0 y 8,0, o agua.

La formulación líquida de aerosol puede incluir, como ingredientes opcionales, portadores, agentes de solubilización o emulsión, tensioactivos y excipientes farmacéuticamente aceptables. La formulación puede incluir un portador. El portador es una macromolécula que es soluble en el sistema circulatorio y que es fisiológicamente aceptable en el que aceptación fisiológica significa que los expertos en la materia aceptarían la inyección de dicho portador en un paciente como parte de un régimen terapéutico. El portador preferentemente es relativamente estable en el sistema circulatorio con una vida media en el plasma aceptable para su eliminación. Dichas macromoléculas pueden incluir lecitina de soja, ácido oleico y trioleato de sorbitán, siendo preferido el trioleato de sorbitán.

Las formulaciones pueden incluir también otros agentes útiles para el mantenimiento del pH, la estabilización de la solución o para la regulación de la presión osmótica. Ejemplos de los agentes pueden incluir sales, tales como cloruro sódico o cloruro de potasio y carbohidratos, tales como glucosa, galactosa o manosa y similares.

También se describen formulaciones líquidas de aerosol que comprenden el agente inhibidor de adhesina y otro fármaco terapéuticamente eficaz, tal como un antibiótico, un esteroide, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, etc.

5 *Formulaciones de aerosol en polvo seco.* La presente formulación de aerosol puede prepararse como una formulación en polvo seco que comprende una forma en polvo finamente dividido del agente inhibidor de adhesina y un dispersante.

10 Las formulaciones para administrar desde un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene agente (o derivado) inhibidor de adhesina y pueden incluir también un agente de relleno, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa o manitol en cantidades que facilitan la dispersión del polvo desde el dispositivo, p. ej., 50 a 90% en peso de la formulación. El agente (o derivado) inhibidor de adhesina debería prepararse de la manera más ventajosa en forma de partículas con un tamaño medio de partícula inferior a 10 μm (o micras), lo más preferentemente entre 0,5 y 5 μm , para la administración más eficaz al pulmón distal. En otro ejemplo, la formulación en polvo seco puede comprender un polvo seco finamente dividido que contiene agente inhibidor de adhesina, un agente dispersante y un agente de relleno. Los agentes de relleno útiles en unión con la presente formulación incluyen agentes tales como lactosa, sorbitol, sacarosa o manitol, en cantidades que facilitan la dispersión del polvo desde el dispositivo.

20 Se describen además formulaciones en polvo seco que comprenden un agente inhibidor de adhesina y otro fármaco terapéuticamente eficaz, tal como un antibiótico, un esteroide, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo, etc.

25 Se describen también formas farmacéuticas orales sólidas, que están descritas generalmente en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª ed. 1990 (Mack Publishing Co. Easton PA 18042) en el capítulo 89. Las formas farmacéuticas sólidas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, tabletas o pastillas, sellos o bolitas. Asimismo, puede utilizarse la encapsulación liposómica o proteínica para formular las composiciones (como, por ejemplo, microesferas proteínicas descritas en la patente US nº 4.925.673). Puede utilizarse la encapsulación liposómica y los liposomas pueden modificarse con varios polímeros (p. ej., patente US nº 5.013.556). Una descripción de las posibles formas farmacéuticas sólidas para utilización terapéutica se dan en Marshall, K. en: *Modern Pharmaceutics* editado por G. S. Banker y C. T. Rhodes capítulo 10, 1979.

30 En general, la formulación incluirá el componente o componentes (o formas químicamente modificadas del mismo) e ingredientes inertes que permiten la protección contra el medio estomacal, y la liberación del material biológicamente activo en el intestino.

35 También se describen formas farmacéuticas orales del componente o componentes modificados anteriormente. El componente o componentes pueden modificarse químicamente de modo que la administración oral del derivado sea eficaz. Generalmente, la modificación química consiste en la fijación de por lo menos un grupo a la propia molécula del componente, en la que dicho grupo permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) la absorción en el torrente sanguíneo procedente del estómago o del intestino. Asimismo se desea el aumento de la estabilidad general del componente o componentes y el aumento en el tiempo de circulación en el cuerpo. Ejemplos de dichos grupos incluyen: polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y poliprolina. Abuchowski y Davis, 1981, "Soluble Polymer-Enzyme Adducts" en: *Enzymes as Drugs*, Hosenberg y Roberts, eds., Wiley-Interscience, Nueva York, NY, págs. 367-383; Newmark, *et al.* (1982) *J. Appl. Biochem.* 4:185-189. Otros polímeros que podrían utilizarse son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano. Los preferidos para su utilización farmacéutica, como se indicó anteriormente, son los grupos de polietilenglicol.

50 Para el componente (o derivado) la posición de liberación puede ser el estómago, el intestino delgado (duodeno, yeyuno o íleon) o el intestino grueso. Un experto en la materia tiene formulaciones disponibles que no se disolverán en el estómago, aunque liberarán el material en el duodeno o en cualquier parte en el intestino. Preferentemente, la liberación impedirá los efectos perjudiciales del medio estomacal, ya sea por protección de la proteína (o derivado) o por liberación del material biológicamente activo más allá del medio estomacal, tal como en los intestinos.

55 Para asegurar la resistencia gástrica completa es esencial un recubrimiento impermeable hasta por lo menos pH 5,0. Ejemplos de los ingredientes inertes más frecuentes que se utilizan como recubrimientos entéricos son el acetato trimelitato de celulosa (CAT), el ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, acetato ftalato de polivinilo (PVAP), Eudragit L30D, Aquateric, acetato ftalato de celulosa (CAP), Eudragit L, Eudragit S y goma laca. Estos recubrimientos pueden utilizarse como películas mezcladas.

60 Puede utilizarse también un recubrimiento o mezcla de recubrimientos en comprimidos, que no está destinado para la protección del estómago. Éste puede incluir recubrimientos de azúcar o recubrimientos que facilitan la ingestión del comprimido. Las cápsulas pueden estar constituidas por una cubierta dura (tal como gelatina) para la administración de producto terapéutico seco, es decir en polvo; para las formas líquidas, puede utilizarse una cubierta blanda de gelatina. El material de la cubierta de los sellos podría ser almidón espeso u otro papel comestible. Para las píldoras, pastillas, comprimidos moldeados o triturados de comprimidos, pueden utilizarse técnicas de amasado en húmedo.

65 El péptido terapéutico puede estar incluido en la formulación en forma de multipartículas finas en forma de gránulos o bolitas de tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para la administración de

cápsulas podría también ser en forma de polvo, torundas ligeramente comprimidas o incluso como comprimidos. El producto terapéutico podría prepararse por compresión. Pueden incluirse todos los colorantes y agentes saborizantes. Por ejemplo, la proteína (o derivado) puede formularse (tal como mediante liposomas o encapsulación en microesferas) y además contenido dentro de un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes saborizantes.

Se puede diluir o aumentar el volumen del producto terapéutico con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir carbohidratos, especialmente manitol, α -lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextrano modificado y almidón. Determinadas sales inorgánicas pueden también utilizarse como cargas incluyendo el trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro sódico. Algunos diluyentes comercialmente disponibles son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

Pueden incluirse disgregadores en la formulación del producto terapéutico en forma farmacéutica sólida. Los materiales utilizados como disgregadores incluyen pero no se limitan a almidón, incluyendo el disgregador comercial a base de almidón, Explotab. Pueden utilizarse almidón glucolato sódico, Amberlite, carboximetilcelulosa sódica, ultramilopectina, alginato sódico, gelatina, cáscara de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de disgregadores son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Pueden utilizarse gomas en polvo como disgregadores y como aglutinantes y éstas pueden incluir gomas en polvo tal como agar-agar, Karaya o tragacanto. Son también útiles como disgregadores el ácido algínico y su sal sódica. Pueden utilizarse aglutinantes para mantener el agente terapéutico unido para formar un comprimido duro e incluir materiales de productos naturales tales como acacia, tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). Pueden utilizarse tanto la polivinilpirrolidona (PVP) como la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en soluciones alcohólicas para granular el agente terapéutico.

Puede incluirse un agente contra la fricción en la formulación del agente terapéutico para prevenir la adherencia durante el proceso de formulación. Pueden utilizarse lubricantes como una capa entre el agente terapéutico y la pared del molde, y éstos pueden incluir pero no se limitan a; ácido esteárico incluyendo sus sales de magnesio y de calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. Pueden utilizarse también lubricantes solubles tales como laurilsulfato sódico, laurilsulfato de magnesio, polietilenglicol de varios pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.

Pueden añadirse fluidificantes que pueden mejorar las propiedades del fluido del fármaco durante la formulación y para ayudar a la redistribución durante la compresión. Los fluidificantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirógena y silicoaluminato hidratado.

Para ayudar a la disolución del agente terapéutico en el medio acuoso puede añadirse un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como laurilsulfato sódico, sulfosuccinato de dioctil sodio y sulfonato de dioctil sodio. Pueden utilizarse detergentes catiónicos y podrían incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetomio. La lista de detergentes no iónicos potenciales que podrían incluirse en la formulación como tensioactivos son laurmacrogol 400, estearato de polioxil 40, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de sacarosa y ácido graso, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos tensioactivos podrían estar presentes en la formulación de la proteína o derivado bien solos o como mezcla en diferentes proporciones.

Los aditivos que aumentan potencialmente la absorción del polipéptido (o derivado) son por ejemplo los ácidos grasos, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico.

Administración pulmonar. En la presente memoria se describe también la administración pulmonar del presente polipéptido (o de los derivados del mismo). El polipéptido (o derivado) se administra a los pulmones de un mamífero mientras que se inhala y se recubre la superficie de la mucosa de los alvéolos. Otros artículos al respecto incluyen Adjei *et al.* (1990) *Pharmaceutical Research*, 7:565-569; Adjei *et al.* (1990) *Internacional Journal of Pharmaceutics*, 63:135-144 (acetato de leuprolida); Braquet *et al.* (1989), *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 13 (supl. 5):143-146 (endotelina-1); Hubbard *et al.* (1989) *Annals of Internal Medicine*, Vol. III, págs. 206-212 (α 1-antitripsina); Smith *et al.* (1989) *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (α 1-proteinasa); Oswein *et al.*, "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, marzo, (1990) (hormona de crecimiento humano recombinante); Debs *et al.* (1988) *J. Immunol.* 140:3482-3488 (interferón-g y factor alfa de la necrosis tumoral); Platz *et al.*, patente US nº 5.284.656 (factor estimulante de colonias de granulocitos)]. Un procedimiento y una composición para la administración pulmonar de fármacos para efecto generalizado se describe en la patente US nº 5.451.569, publicada el 19 de septiembre de 1995 concedida a Wong *et al.*

Para su utilización se contempla una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo pero sin limitarse a nebulizadores, inhaladores dosificadores de dosis e inhaladores de polvo, todos los cuales son conocidos por los expertos en la materia.

Las formulaciones adecuadas para su utilización con un nebulizador, ya sea de chorro a presión o ultrasónico, comprenderán típicamente el polipéptido (o derivado) disuelto en agua a una concentración entre aproximadamente 0,1 y 25 mg de la proteína biológicamente activa por ml de solución. La formulación puede incluir también un tampón y un azúcar sencillo (p. ej., para la estabilización de la proteína y regulación de la presión osmótica). La formulación del

nebulizador puede contener también un tensioactivo, para reducir o prevenir la agregación producida por la superficie de la proteína producida por atomización de la solución en la formación del aerosol.

Las formulaciones para su utilización con un dispositivo inhalador dosificador comprenderán generalmente un polvo finamente dividido que contiene el polipéptido (o derivado) en suspensión en un propulsor con ayuda de un tensioactivo. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para este fin, tal como un clorofluorocarburo, un hidroclorofluorocarburo, un hidrofluorocarburo o un hidrocarburo, incluyendo triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen el trioleato de sorbitán y la lecitina de soja. El ácido oleico puede también ser útil como tensioactivo.

Las formulaciones para administrar desde un dispositivo inhalador de polvo comprenderán un polvo seco finamente dividido que contiene polipéptido (o derivado) y pueden incluir también un agente de relleno, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa o manitol en cantidades que facilitan la dispersión del polvo desde el dispositivo, p. ej., 50 a 90% en peso de la formulación. La proteína (o derivado) debería prepararse de la manera más ventajosa en forma de partículas con un tamaño medio de partícula inferior a 10 μm (o micras), lo más preferentemente entre 0,5 y 5 μm , para la administración más eficaz al pulmón distal.

Administración nasal. Se describe también la administración nasal o nasofaríngea del polipéptido (o derivado). La administración nasal permite el paso del polipéptido directamente sobre la mucosa del aparato respiratorio superior después de administrar el producto terapéutico a la nariz, sin necesidad de deposición del producto en los pulmones. Las formulaciones para administración nasal incluyen aquellas con dextrano o ciclodextrano.

Las composiciones terapéuticas que contienen polipéptido, análogo o fragmento activo se administran de forma convencional por vía intravenosa, tal como por ejemplo, por inyección de una dosis unitaria. La expresión "dosis unitaria" cuando se utiliza en referencia a una composición terapéutica se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para seres humanos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado junto con el diluyente requerido; es decir, el portador o vehículo.

Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que debe administrarse depende del paciente que debe tratarse, de la capacidad del sistema inmunitario del individuo para utilizar el ingrediente activo y del grado de inhibición o neutralización de la capacidad de fijación deseada. Las cantidades exactas de ingrediente activo requeridas que deben administrarse dependen del criterio del médico de cabecera y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, las dosis adecuadas pueden estar comprendidas entre aproximadamente 0,1 y 20, preferentemente entre 0,5 y aproximadamente 10, y más preferentemente uno a varios, miligramos de ingrediente activo por kilogramo de peso corporal del individuo al día y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo son también variables, pero están tipificados por una administración inicial seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas mediante una inyección u otra administración posteriores. Alternativamente, se contempla la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones de diez nanomolar a diez micromolar en la sangre.

La invención puede entenderse mejor haciendo referencia a los siguientes Ejemplos no limitativos, que se proporcionan a título de ejemplo de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las formas de realización preferidas de la invención y no deberían considerarse en modo alguno, sin embargo, como limitativos del amplio alcance de la invención.

Ejemplo 1

Identificación de los genes de estreptococo del grupo B

Comparando la composición genética y fenotípica de los grupos relacionados genéticamente de una especie bacteriana se facilita la identificación de factores de virulencia presentes en la mayoría de los grupos patógenos. El GBS de tipo III puede subdividirse en tres grupos de cepas relacionadas basadas en el análisis de los modelos del digesto de restricción (RDP) producidos por la digestión del ADN cromosómico con Hind III y Sse 8387 (5, 6). Más del 90% de la enfermedad por GBS de tipo III invasiva en recién nacidos en Japón y en Salt Lake City es producida por bacterias de uno de los tres tipos de RDP, denominados RDP de tipo III-3, mientras que RDP de tipo III-2 es significativamente más probable que se aislen de la vagina que de la sangre o de CSF (6). Estos resultados sugieren que este grupo de GBS de tipo III-3 genéticamente relacionado son más virulentos que las cepas III-2 y podrían ser responsables de la mayoría de la enfermedad de tipo III invasiva en conjunto. Los autores proponen que los factores bacterianos que contribuyen al aumento de la virulencia de las cepas III-3 pueden identificarse caracterizando las diferencias entre la composición genética de las cepas III-3 y III-2. Dichas diferencias genéticas se encontrarán en los cromosomas bacterianos ya que estas cepas no contienen plásmidos (6).

Para identificar los genes presentes en las cepas de GBS de tipo III-3 virulentas y no en las cepas de tipo III-2 no virulentas los autores utilizaron una modificación de la técnica descrita por Lisitsyn *et al.* (7). El ADN genómico de alto peso molecular procedente de una cepa de GBS de tipo III-3 de RDP invasivo (cepa 874391) y una cepa de tipo III-2 de RDP colonizador ("no virulenta") (cepa 865043) se preparó por lisis celular con mutanolisina y digestión

con proteinasa K (5). Para la sustracción genética, se digirió el ADN genómico de ambas cepas con Taq I. El ADN digerido con Taq I procedente de la cepa virulenta se mezcló con dos oligonucleótidos complementarios (TaqA (5'-CTAGGTGGATCCTTCGGAAT-3' (SEC. ID. n°: 11)) y TaqB (5'-CGATTGCCGA-3' (SEC. ID. n°: 12)), se calentó a 50°C durante 5 minutos, a continuación se dejó enfriar lentamente a 16°C en tampón de T4 ligasa. Se ligaron los oligonucleótidos al ADN de la cepa virulenta por incubación con 20 unidades de T4 ligasa a 16°C durante 12 horas. Tras la ligadura, 500 ng de ADN de la cepa virulenta, con enlazadores ligados, y 40 µg de ADN de la cepa no virulenta, sin enlazadores, se mezclaron, se desnaturalizaron por calentamiento y se hibridaron a 68°C durante 20 horas.

El diez por ciento de la mezcla de hibridación resultante se incubó con Taq ADN polimerasa y los dNTP para completar los extremos del ADN de la cepa virulenta hibridada. El ADN hibridado se amplió mediante Taq ADN polimerasa durante 10 ciclos utilizando el TaqA oligonucleótido como cebador de ampliación transcrito y complementario. Después de la ampliación, los productos monocatenarios que permanecen tras la ampliación se digirieron con nucleasa de la alubia mung. El veinte por ciento del producto resultante se volvió a ampliar a continuación durante 20 ciclos. Este procedimiento de sustracción seguido de ampliación por PCR produce un aumento de la ampliación de los segmentos de ADN de las cepas III-3 que no se hibridan con los segmentos de ADN procedentes de las cepas III-2.

Se realizaron un total de cuatro ciclos de sustracción y ampliación, utilizando sucesivamente pequeñas cantidades de productos de PCR específicos para III-3 y alternando dos series de adaptadores (TaqA/B (SEC. ID. n°: 11 y n°: 12, respectivamente) y TaqE/F (TaqE (5'-AGGCAACTGTGCTAACCGAGGGAAT-3' (SEC. ID. n°: 13)); y TaqF (5'-CGATTCCCTCG-3') (SEC. ID. n°: 14)). Los productos de la ampliación final se ligaron en vectores PBS KS+. Se seleccionaron al azar trece clones para análisis. Se utilizaron estas sondas en experimentos de transferencia de huellas y manchas para determinar si la sustracción tuvo éxito y para identificar las sondas que se hibridan con todas las cepas III-3. Cada una de las 6 sondas únicas se hibridó con la cepa virulenta III-3 paterna, mientras que ninguna de las sondas se hibridó con las cepas III-2 no virulentas. Dos de las etiquetas de la secuencia ampliada (clones DY1-1 y DY1-11) se hibridaron con el ADN genómico de las 62 cepas de tipo III, pero no se hibridaron con el ADN preparado a partir de las cepas III-2 y III-1 (Figura 1). Para obtener información de la secuencia adicional, los autores construyeron un banco genómico GBS III-3. Las múltiples placas que se hibridan con cada una de las sondas específicas para III-3 GBS se han purificado para la caracterización adicional.

Resultados

Locus spb

Se identificaron tres clones genómicos solapantes que se hibridan con la sonda DY1-1. Se subclonó y se secuenció un fragmento Sal I-Bgl II de 6,4 kb presente en cada clon. Este ADN genómico está presente en todas las cepas de tipo III-3 de RDP pero no en las cepas de serotipo III-2, III-1 o de otros serotipos de GBS.

Más del 90% de este fragmento de ADN genómico se ha secuenciado y se ha descubierto que contiene 5 marcos de lectura abiertos (ORF). Dos ORF parecen ser candidatos para genes virulentos. *spb 1* es un ORF de 1509 bp. La proteína prevista (502 aminoácidos y Mr 53.446) tiene las características de una proteína unida a la membrana celular. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos previstas de *spb 1* se proporcionan en las SEC. ID. n°: 15 y n°: 16, respectivamente. El terminal N de la proteína prevista es un tramo básico, hidrófilo de 6 aminoácidos seguido de un núcleo rico en prolina, hidrófobo de 23 aminoácidos, consistente en un péptido señal. La proteína madura hidrófila termina en un dominio LPXTG (SEC. ID. n°: 17) típico que precede inmediatamente a un núcleo hidrófobo de 20 aminoácidos y un terminal hidrófilo básico corto. La secuencia de nucleótidos no es homóloga a las secuencias de otros genes bacterianos conocidos. La secuencia de aminoácidos traducida, sin embargo, comparte homología de segmentos con un número de proteínas caracterizadas, incluyendo la proteína tipo 2 de la franja de *Actinomyces naeslundii* (27% de identidad en 350 aminoácidos) y la proteína de tipo I de la franja de *Actinomyces viscosus* (25% de homología en 420 aminoácidos) (16), la proteína superficial T6 de *S. pyogenes* (23% de identidad en 359 aminoácidos) (20), y la hsf (27% de identidad en 260 aminoácidos) y las adhesinas de HMW1 (25% de identidad en 285 aminoácidos) de *Haemophilus influenzae* (21, 22). La función de la proteína T6 de *S. pyogenes* es desconocida. Cada uno de los demás homólogos desempeña una función en la adherencia y/o invasión bacteriana.

Se creó una cepa de GBS mutante con delección isógona *spb 1*⁻ por recombinación homóloga (utilizando el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 a continuación) y se determinó la capacidad del mutante *spb 1*⁻ para adherirse a las células epiteliales respiratorias A549 e invadir las. En comparación con la cepa natural, el número de bacterias *spb 1*⁻ adherentes a las monocapas de A549 se redujo el 60,0% (p<0,01) y el número de bacterias intracelulares invasoras se redujo el 53,6% (p<0,01). Estos datos sugieren que *spb1* puede contribuir a la patogénesis de la neumonía por GBS y a la entrada de bacterias en el torrente sanguíneo.

El segundo ORF, *spb2*, termina 37 bp corriente arriba del *spb1* y está en la misma orientación de la transcripción. Este ORF de 1692 bp tiene una secuencia de aminoácidos deducida de 579 restos y Mr 64.492. Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos previstas de *spb2* se proporcionan en las SEC. ID. n°: 18 y n°: 19, respectivamente. *spb2* comparte el 50,5% de identidad de ácido nucleico y el 20,7% de la identidad de aminoácidos con *spb1*. La conservación es mayor en las zonas del terminal carboxi, incluyendo un motivo LPSTGG (SEC. ID. n°: 20) compartido. En contraste con *spb1*, *spb2* no presenta una secuencia con señal obvia. Su secreción puede estar mediada por las secuencias de reconocimiento del terminal carboxi o por péptidos accesorios (23). La secuencia de aminoácidos deducida de *Spb2*

es también homóloga con las proteínas T6 de *S. pyogenes* y de *Actinomyces naeslundii*, y con internalina A de *Listeria monocytogenes* (22% de identidad en 308 aminoácidos); de nuevo, las proteínas son importantes en la adherencia y la invasión (24).

5 *Locus ema*

Se identificaron dos clones genómicos que se hibridan con la sonda DY1-11. Se subclonó y secuenció un fragmento Hind III de 7 kb presente en cada clon. A diferencia de las secuencias spb específicas para el serotipo III, este ADN genómico, que es adyacente a una zona del ADN específico para el serotipo III-3, se descubrió que estaba presente en todas los GBS probados hasta la fecha, incluyendo las cepas de serotipo Ia, Ib, II y V. Esta zona del cromosoma de GBS, de la cual los autores han diseñado el locus de adhesina de la matriz extracelular (*ema*), contiene 5 ORF significativos.

15 *emaA*

El primer ORF, *emaA*, tiene una longitud de 738 bp, con un producto proteico previsto de 246 aminoácidos y Mr 26,2. La secuencia de ácido nucleico (SEC. ID. n°: 1) y la secuencia de aminoácidos prevista (SEC. ID. n°: 2) de *emaA* se presentan en la Figura 2. La proteína EmaA es una proteína no repetitiva. El terminal N de 27 aminoácidos de la proteína prevista es coherente con un péptido señal. La proteína madura tiene un dominio imperfecto que se une a la pared celular (XPXTGG (SEC. ID. n°: 21)) seguido de un dominio que se extiende a través de la membrana que abarca los restos 219 a 235 y una cola hidrófila terminal. La secuencia nucleotídica *emaA* no es homóloga a las secuencias conocidas de los genes bacterianos. La secuencia de aminoácidos traducida, sin embargo, comparte homología de segmentos con numerosas proteínas caracterizadas, incluyendo la adhesina del colágeno, Bbp, de *Staphylococcus aureus* (identidad del 37% en 103 aa) (15), una subunidad estructural de la franja de tipo 2 de *Actinomyces naeslundii* (39% de homología en 112 aa) (16), y la proteína FimP de *Actinomyces viscosus* (28% de homología en 228 aa) (17). La función de la proteína T6 de *S. pyogenes* es desconocida. Las franjas de tipo 1 y tipo 2 de *Actinomyces* median la adherencia bacteriana a las glucoproteínas salivares y a varias células huésped, contribuyendo a la patogénesis de la caries dental.

30 *emaB*

El segundo ORF, *emaB*, empieza 94 bp 3' de *emaA* y está en la misma orientación de la transcripción. La secuencia de ácido nucleico (SEC. ID. n°: 3) y la secuencia de aminoácidos prevista (SEC. ID. n°: 4) de *emaB* se presentan en la Figura 3. Tiene una longitud de 924 bp; con un producto de la proteína previsto de 308 aminoácidos y Mr de 33,9. La proteína EmaB es una proteína no repetitiva. El terminal N de 27 aminoácidos de la proteína prevista es consecuencia de un péptido señal. La proteína madura tiene un dominio imperfecto que se une a la pared celular (XPXTG) seguido de un dominio que se extiende a través de la membrana que comprende los restos 279 a 294. La secuencia nucleotídica *emaB* no es homóloga a las secuencias conocidas de los genes bacterianos. La secuencia de aminoácidos traducida, sin embargo, comparte homología de segmentos con numerosas proteínas caracterizadas, incluyendo la subunidad estructural de las franjas de tipo 2 de *Actinomyces naeslundii* (28% de homología en 222 aminoácidos), la proteína T6 de *S. pyogenes* (26% de homología en 266 aminoácidos) (20) y una supuesta adhesina de la superficie celular de *S. epidermidis* (24% de identidad en 197 aminoácidos). La primera de estas proteínas media en la adherencia de *S. aureus* al colágeno y se supone que contribuye a la patogénesis de la osteomielitis y la artritis infecciosa.

45 *emaC*

El tercer ORF, *emaC*, empieza 2 bp 3' de EmaB y está en la misma orientación de la transcripción. Tiene una longitud de 918 bp; con un producto de la proteína previsto de 305 aminoácidos y Mr de 34,5. La secuencia del ácido nucleico (SEC. ID. n°: 5) y la secuencia de aminoácidos prevista (SEC. ID. n°: 6) de *emaC* se representan en la Figura 4. La proteína EmaC es una proteína no repetitiva. El terminal N de 30 aminoácidos de la proteína prevista es consecuencia de un péptido señal. La proteína madura tiene un dominio que se extiende a través de la membrana que comprende los restos 265 a 281 y una cola hidrófila terminal. La secuencia nucleotídica de *emaC* no es homóloga a las secuencias conocidas de los genes bacterianos. La secuencia de aminoácidos traducida, sin embargo, comparte homología de segmentos con numerosas proteínas caracterizadas, incluyendo las proteínas asociadas al montaje de la subunidad estructural de la franja de tipo 2 de *Actinomyces naeslundii* (38% de homología en 234 aminoácidos) (16). Estas proteínas se necesitan para el montaje de las franjas de tipo 2.

60 *emaD*

El cuarto ORF, *emaD*, tiene una longitud de 852 bp, solapa a *emaC* mediante 47 bp, y está en la misma orientación de la transcripción. El producto proteico previsto es de 284 aminoácidos y Mr 33,1. La secuencia de ácido nucleico (SEC. ID. n°: 7) y la secuencia de aminoácidos prevista (SEC. ID. n°: 8) de *emaD* se presentan en la Figura 5. La secuencia señal N-terminal no identificable está presente y los potenciales segmentos transmembranarios están presentes en las posiciones 19 a 35 y 252 a 280. La proteína madura no es repetitiva y carece de un dominio de unión a la pared celular. La secuencia nucleotídica de *emaD* no es homóloga con las secuencias conocidas de los genes bacterianos. La secuencia de aminoácidos traducida, comparte homología del segmento con las mismas proteínas asociadas a las franjas de *Actinomyces* como lo hace EmaC.

emaE

El quinto ORF, *emaC*, empieza 42 bp 3' de EmaB y está en la misma orientación de la transcripción. Tiene una longitud de 2.712 bp; con un producto de la proteína previsto de 904 aminoácidos y Mr de 100,9. La Figura 6 representa la secuencia del ácido nucleico (SEC. ID. nº: 9) y la secuencia de aminoácidos prevista (SEC. ID. nº: 10) de *emaE*. La proteína EmaE prevista es una proteína no repetitiva. Un péptido señal obvio del terminal N no es evidente pero una supuesta zona transmembranaria está situada en los restos 24 a 40. La proteína madura tiene un dominio de unión a la pared celular imperfecto (XPXTGG (SEC. ID. nº: 21)) seguido de un dominio que comprende transmembrana que comprende los restos 880 a 896. La secuencia de nucleótidos *emaE* no es homóloga con las secuencias conocidas de los genes bacterianos. La secuencia de aminoácidos traducida, sin embargo, comparte homología de segmentos con numerosas proteínas caracterizadas, incluyendo las proteínas de unión a la fibronectina F1 y F2 de *S. pyogenes* (31% de homología en 207 aminoácidos) (18, 19). Estas proteínas median la unión por alta afinidad a la fibronectina, y son importantes en la adherencia de *S. pyogenes* a las células respiratorias.

La similitud de los productos proteicos del locus *ema* a adhesinas e invasinas fisiológicamente importantes de otras especies bacterianas sugiere que las proteínas Ema desempeñan una función facilitando la adherencia de GBS a los componentes de la matriz extracelular y a las superficies celulares y la invasión posterior de células epiteliales y endoteliales, las etapas iniciales en la patogénesis de la infección.

Varias líneas de prueba sugieren que los miembros del locus *ema* y del *spb* pueden tener funciones similares, pero es probable que representen distintas clases de proteínas. Los genes del locus *ema* y *spb* son cada uno y todos similares a las adhesiones e invasiones fisiológicamente importantes de las especies bacterianas, sin embargo, tanto Spb1 como Spb2 tienen dominios prototípicos de unión a la pared celular gram positivos, mientras que los miembros del locus *ema* tienen un motivo infrecuente, lo que sugiere un mecanismo distinto del anclaje en la superficie celular. En segundo lugar el locus *spb* está restringido a las cepas de serotipo III-3 virulento de GBS, mientras que el locus *ema* parece estar omnipresente en todos los serotipos de GBS. En tercer lugar *spb1* y *spb2* son más homólogos entre sí que los miembros del locus *ema* y los genes *ema* son más estrechamente homólogos entre sí que con *spb1* y *spb2*.

Ejemplo 2

*Caracterización biológica de nuevos genes de GBS**Cepas bacterias mutantes isógenas*

Para identificar la actividad biológica de estos nuevos genes de GBS, se crean cepas bacterianas mutantes isógenas que son idénticas desde todos los puntos de vista excepto por la presencia o ausencia de un gen específico. Los mutantes con delección se crean por sustitución alélica. El gen relevante, con 100 a 300 bp de secuencias de flaqueo, se subclona y modifica mediante la delección de un fragmento intragénico de la secuencia de codificación y, en algunos casos, la inserción de un gen con resistencia a la kanamicina. El gen mutante se clona en el vector pHY304 suicida (proporcionado gentilmente por el Dr. Craig Rubens), un plásmido huésped de amplio espectro que contiene un gen ori sensible a la temperatura, con resistencia a la eritromicina (*erm^{TS}*), y un punto de clonación múltiple pBS. El vector pHY304 es un derivado del vector pWV01 (Framson, P. E. *et al.* (1997) *Applied Environ Microbiology* 63:3539-3547). Los plásmidos que contienen genes mutantes se electroporan en la cepa 874391 y se seleccionan mutantes con entrecruzamiento único por resistencia antibiótica a 37°C. Las colonias resistentes al antibiótico resultantes se someten a un cambio de temperatura a 30°C. La integración del plásmido es inestable a esta temperatura permisiva debido a que existen dos ori funcionales en el cromosoma. El plásmido escindido se elimina por cultivo en un medio no selectivo para muchas generaciones, a continuación se criba la presencia del alelo mutante en las colonias por sensibilidad a la eritromicina. Los mutantes con doble entrecruzamiento son estables y no requieren mantenimiento en la selección del fármaco. El genotipo mutante se confirma por transferencia Southern o demostrando por PCR la delección apropiada. Se criba la presencia de la expresión génica en los mutantes resultantes por análisis de transferencia Northern y Western. El fenotipo de los mutantes modificados genómico se compara a continuación con el de la cepa 874391 natural examinando la velocidad de crecimiento y la morfología de la colonia, y la expresión de β -hemolisina y el factor CAMP. Se evalúa la expresión de la proteína superficial por transferencia Western, utilizando sueros policlonales de conejos inmunizados con GBS de tipo III completo, destruido térmicamente.

Modelos in vitro*A. Adherencia*

La adherencia de GBS a las células huésped es un requisito previo para la enfermedad invasiva. Tres tipos de células diferentes presentan el potencial para ser importantes en este proceso: i) la adherencia a las células epiteliales respiratorias es probable que facilite el infecciones neonatales de comienzo más precoz, ii) la adherencia a las células epiteliales gastrointestinales se ha supuesto que es importante en la patogénesis de las infecciones neonatales de comienzo tardío, y iii) la adherencia a las células endoteliales es necesaria tanto para la endocarditis como para otras infecciones endovasculares, y es probable que sea el episodio inicial en la meningitis por GBS. La capacidad de las cepas naturales y mutantes para adherirse a las células epiteliales y endoteliales se compara en los ensayos de adherencia.

Se utilizan cuatro estirpes celulares diferentes para investigar la función de los nuevos genes de GBS en la adherencia. Los GBS se adhieren a las células de carcinoma epitelial alveolar humano A549 y las invaden y las proteínas superficiales parecen desempeñar una función importante en este proceso (8). La unión de GBS a las células A549 se utiliza como modelo para la colonización respiratoria *in vitro*. GBS también se adhiere a C2BBel, una estirpe celular epitelial intestinal humana, que se utiliza como modelo para la colonización gastrointestinal, y a las células HeLa epiteliales cervicales, un modelo para la colonización genital y la infección maternal. Para la adherencia endotelial, se estudian dos líneas celulares: células endoteliales de la vena umbilical humanas (HUV) recién aisladas; y una estirpe celular endotelial microvascular del cerebro (BMEC) humana inmortalizada. Los ensayos de adherencia se realizan como describe Tamura *et al.* (9). Las líneas celulares se cultivan hasta confluencia en placas de cultivo tisular de 96 pocillos en los medios recomendados. Se lavan las monocapas con PBS y se fijan con glutaraldehído al 0,5%. Después del bloqueo con BSA al 5% en PBS, se inoculan las células con varios inóculos de GBS, se centrifugan durante 10 minutos a 2.000 rpm y se incuban durante 1 hora a 4°C. Las bacterias no adherentes se eliminan lavando tres veces con leche en polvo descremada al 5% en PBS y las bacterias unidas se eluyen a continuación y se siembran en placas cuantitativamente.

B. *Invasión*

Las GBS se adhieren al epitelio respiratorio, al endotelio y a BMEC y los invaden (8, 10, 11). Se determina la capacidad de las cepas de GBS naturales y mutantes isógenas para invadir tanto las células epiteliales como las endoteliales como se describió anteriormente (8, 10, 11). Los ensayos que distinguen la capacidad de GBS para invadir las células eucarióticas frente a adherirse a las células capitalizan la inestabilidad de la penicilina y la gentamicina para introducirse en las células huésped, lo que permite la cuantificación de las bacterias intracelulares una vez destruidas las bacterias extracelulares. Se cultivan GBS hasta la fase de crecimiento deseada en caldo de cultivo TH, se lavan dos veces con PBS y se vuelven a poner en suspensión en medio de cultivo tisular que contiene suero de ternero fetal al 10%. Monocapas de cultivo tisular cultivadas hasta confluencia en placas de 24 pocillos se inoculan con inóculos variables de GBS, se centrifugan a $800 \times g$ y se incuban a 37°C en CO₂ al 5% durante 2 a 6 horas. Se eliminan las bacterias extracelulares lavando cuatro veces con PBS. Las células se incuban a continuación en medio reciente con 5 mg/ml de penicilina y 100 mg/ml de gentamicina durante 2 horas. Los medios se eliminan a continuación, se lavan las monocapas y se lisan las células por tratamiento con Triton X-100 al 0,025%. Los lisados celulares se tratan con ultrasonidos para destruir las cadenas bacterianas y se colocan alícuotas en placas cuantitativamente.

C. *Anticuerpo contra proteínas de GBS*

Se prueba la capacidad del anticuerpo específico contra las nuevas proteínas de GBS para facilitar la destrucción opsonofagocítica de GBS (12). Se inmunizan conejos con proteínas GBS recombinantes o purificadas producidas por técnicas normalizadas. El antisero de conejo de diferentes diluciones (comprendidas entre 1/50 y 1/5.000) que ha sido absorbido exhaustivamente con la cepa mutante isógena relevante a 4°C se incubará con GBS en presencia de complemento humano y leucocitos polimorfonucleares (3×10^6). La destrucción opsonofagocítica se expresa como el log del número de CFU que sobreviven después de 1 hora de incubación sustraído del log del número de CFU en el punto de tiempo cero. La destrucción de cepas naturales se compara con la de mutantes isógenos que carecen de nuevas proteínas de GBS.

Modelos in vivo

La rata recién nacida ha sido utilizada por numerosos laboratorios como modelo de infección de GBS porque simula con detalle la infección del ser humano recién nacido (13). La contribución de nuevos genes a la patogénesis de las infecciones por GBS se prueba comparando el tipo natural y el mutante en este sistema. Se inoculan crías de rata por dos vías. En primer lugar, se inoculan las crías por vía intranasal para simular la infección respiratoria y la septicemia típica del comienzo precoz de la infección por GBS. En segundo lugar, la inoculación intraperitoneal o subcutánea reproduce el alto grado de bacteriemia asociada con la septicemia por GBS y que precede a la meningitis por GBS (14).

Se inoculan crías de rata con dosis variables de cepas de GBS y se determina la mortalidad. Se determina el nivel de bacteriemia mediante cultivos de sangre cuantitativos. Se conservan tejidos de pulmón, hígado, bazo y meninges para examen histológico.

Se determina la capacidad del antisero para las proteínas GBS para proteger las ratas recién nacidas de la infección por GBS (13). Las ratas recién nacidas (<18 horas de vida) reciben una inyección intraperitoneal de 0,5 ml de antisero de conejo no diluido, seguido de la inoculación intraperitoneal del equivalente de una unidad LD50 de GBS (normalmente unas 5.000 bacterias) en PBS. Se determinan a continuación la mortalidad y la morbilidad.

Función de las nuevas proteínas de GBS en vacunas

Varias proteínas superficiales de GBS, incluyendo C y Rib son inmunógenas y protectoras contra la infección por GBS en modelos de roedor lactante (25, 26). Ninguna de estas proteínas está presente en todas las cepas de GBS (27). Además, cada una de estas proteínas tiene una estructura repetitiva. La variabilidad fenotípica de estas proteínas repetitivas permite escapar a los mutantes que expresan formas variantes para evadir los sistemas inmunitarios del huésped y pueden limitar la eficacia de estas vacunas (28). Es destacable que cada una de las proteínas previstas de los locus *spB* y *ema* no tienen una estructura repetitiva y no presentarían este inconveniente.

Las nuevas proteínas de GBS que describen en la presente los autores pueden ser antígenos útiles para una vacuna contra GBS. Los datos presentados en la presente memoria indican que estas proteínas desempeñan una función en la mediación de la adherencia y la invasión de GBS a las células epiteliales humanas, de este modo el anticuerpo contra estos antígenos puede prevenir estas etapas iniciales en la infección. Es muy deseable desarrollar una vacuna que impida la colonización de mujeres embarazadas y otros individuos en situación de riesgo aumentada de infección invasiva por GBS, ya que esto eliminaría la mayoría de las infecciones. Los datos de los autores sugieren que el anticuerpo contra Spb1 es eficaz para reducir la colonización o infección después de la colonización con cepas muy virulentas de serotipo III, y por consiguiente esta proteína es un antígeno de vacuna específicamente útil. Los miembros del locus *ema*, a diferencia de *spb1* y *spb2*, están omnipresentes en GBS y por consiguiente desempeñan una función en la prevención de la infección por serotipos múltiples de GBS. Una formulación de vacuna óptima incluye combinaciones de estos antígenos.

Se utilizan dos estrategias para diseñar vacunas contra GBS utilizando estas nuevas proteínas. En primer lugar, se utilizan proteínas recombinantes purificadas o purificadas por afinidad como antígenos de vacuna, individualmente o en combinación (25). En segundo lugar, estas proteínas se utilizan como proteínas portadoras para vacunas a base de polisacárido u oligosacárido capsular. Los polisacáridos y oligosacáridos de GBS generalmente son poco inmunógenos y no pueden provocar respuestas significativas de recuerdo ni de refuerzo (29). La conjugación de estos polisacáridos u oligosacáridos con portadores de proteína aumenta la inmunogenicidad. El polisacárido GBS conjugado con toxoide contra el tétano, por ejemplo, se ha utilizado para inmunizar mujeres embarazadas y produce grandes concentraciones de anticuerpo contra el polisacárido del suero materno que pueden transferirse al feto en el tercer trimestre del embarazo (30). La selección de las proteínas portadoras apropiadas es importante para el desarrollo de las formulaciones de la vacuna con polisacárido y proteína. Por ejemplo, el poli- u oligosacárido de tipo b de *Haemophilus influenzae* conjugado con diferentes portadores de proteína presenta inmunogenicidad variable y provoca anticuerpos con avidéz variable (31, 32). La inmunización repetida con la misma proteína portadora puede también suprimir las respuestas inmunitarias por competencia con linfocitos B específicos (supresión epitópica) u otros mecanismos. Esto resulta particularmente interesante para el desarrollo de las vacunas contra GBS ya que todas las vacunas del conjugado de polisacárido y oligosacárido con conjugado de proteína desarrolladas recientemente contra las bacterias *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* utilizan un número limitado de proteínas portadoras (toxóide tetánico, CRM197, toxóide diftérico), que aumentan el número de exposiciones a estos portadores que es probable que reciba un individuo. Una vacuna de “diseñador”, compuesta por un polisacárido u oligosacárido de GBS acoplado a una proteína portadora específica para GBS, tal como los nuevos polipéptidos de GBS, proporcionados en esta memoria, particularmente incluyendo Spb1, EmaC y EmaE, pueden ser una estrategia preferible. El gran tamaño de algunos de estos nuevos antígenos de GBS puede presentar también una ventaja para las proteínas con vehículo tradicional ya que el aumento de tamaño está asociado a una mejor inmunogenicidad.

Ejemplo 3

Homólogos de Ema en estreptococos y otras bacterias

Como se expuso anteriormente, las proteínas Ema de GBS comparten homología de segmentos con determinadas proteínas caracterizadas de otras especies bacterianas, incluyendo las proteínas de adherencia y de invasión bacterianas. El homólogo segmentario se observa en el intervalo entre 24 y 39%. Además, las proteínas Ema demuestran alguna homología entre sí. Una comparación de los genes *ema* demuestra que EmaA y EmaB son 47% homólogas, sin embargo, debido a la diferencia en sus longitudes previstas es necesario insertar huecos en la secuencia de EmaA a fin de alinearlas. Las dos proteínas Ema que son más similares en estructura, EmaC y EmaD comparten el 48,7% de homología de aminoácidos entre sí. EmaA/B, EmaC/D y EmaE son cada una $\leq 20\%$ de homólogas entre sí.

Se utilizaron secuencias de *ema* para buscar los genomas microbianos no anotados (Eubacteria). Las proteínas Ema previstas se buscaron frente a las traducciones en los seis marcos (tblast x) de genomas microbianos no anotados acabados e inacabados disponibles en la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se identificó el homólogo del aminoácido segmentario.

EmaA tiene algún homólogo segmentario con *S. pneumoniae*, *E. faecalis*, *B. anthracis* y *C. diphtheriae*. EmaB presenta algún homólogo segmentario con *B. anthracis*. EmaE presenta homología segmentaria con *S. pyogenes* y homología menor con *B. anthracis*.

Se identificó la homología significativa entre EmaC y EmaD de GBS y proteínas en otra especie bacteriana. EmaC presenta homología significativa (55% de identidad sobre 149 aminoácidos) con una zona del cromosoma de *S. pneumoniae* y el cromosoma de *S. pyogenes* (47% de identidad sobre 150 aminoácidos). Se observó homología segmentaria menor en *E. faecalis*, *S. equi* y *C. diphtheriae*. EmaD presenta homología segmentaria acusada (66% sobre 184 aminoácidos) con una zona del cromosoma de *S. pneumoniae*, y menor homología segmentaria con *C. diphtheriae* y *S. pyogenes*.

Los autores han identificado dos homólogos de Ema en *S. pneumoniae*. Estos homólogos de *S. pneumoniae* presentan homología con EmaC y EmaD y, como EmaC y EmaD, también demuestran homología con la proteína asociada a franjas de *Actinomyces*. El ácido nucleico codificador y la secuencia de aminoácidos prevista del primer homólogo EmaC/D de *S. pneumoniae* se proporcionan en las SEC. ID. n°: 24 y n°: 23, respectivamente. El ácido nucleico de la zona del genoma que incluye la secuencia que codifica el primer homólogo se proporciona en la SEC. ID. n°: 22.

El ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos prevista del segundo homólogo de EmaC/D de *S. pneumoniae* se proporcionan en la SEC. ID. nº: 27 y nº: 26 respectivamente. El ácido nucleico de la zona genómica de este segundo homólogo se encuentra en la SEC. ID. nº: 25. Se ha identificado un homólogo de EmaC/D en *Enterococcus faecalis* mediante reconocimiento y análisis. La secuencia de aminoácidos prevista del homólogo de EmaC/D de *E. faecalis* se proporciona en la SEC. ID. nº: 29. La secuencia de ácido nucleico que codifica este homólogo de Ema de *E. faecalis* se proporciona en la SEC. ID. nº: 30. La secuencia de ácidos nucleicos de *E. faecalis* cuya zona genómica codifica el homólogo de EmaC/D se proporciona en la SEC. ID. nº: 28.

Los autores también han identificado un homólogo de EmaD en *Corynebacterium diphtheriae*. La secuencia de aminoácidos prevista del homólogo EmaD de *C. diphtheriae* se proporciona en la SEC. ID. nº: 32. La secuencia de ácidos nucleicos de *C. diphtheriae* que codifica el homólogo se encuentra en la SEC. ID. nº: 33. La secuencia de la zona genómica correspondiente de *C. diphtheriae* se proporciona en la SEC. ID. nº: 31.

Un homólogo de EmaC/D previsto ha sido identificado en *S. pyogenes*. La secuencia de aminoácidos parcial prevista de este homólogo de Ema se proporciona en la SEC. ID. nº: 37.

Una zona de aminoácidos TLLTCTPYMINS/THRLVLR/KG (SEC. ID. nº: 34) se encuentra en EmaC de GBS, EmaD de GBS, tanto en los homólogos EmaC/D de *S. pneumoniae* como en el homólogo Ema de *E. faecalis*. Una secuencia similar TLVTCTPYGINTHRLLVTA (SEC. ID. nº: 35) se encuentra también en el homólogo Ema de *C. diphtheriae*. El homólogo Ema previsto de *S. pyogenes* también tiene una secuencia similar TLVTCTPYGVNTRKLLVRG (SEC. ID. nº: 36).

Lo siguiente es una lista de las referencias citadas en este apartado del Ejemplo.

Referencias

1 **Baker** CJ. Group B streptococcal infections. In Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis. (D. L. Stevens y E. L. Kaplan), New York: *Oxford University Press*, 222-237, 2000.

2 **Blumberg** HM, **Stephens** DS, **Modansky** M, **Erwin** M, **Elliot** J, **Facklam** RR, **Schuchat** A, **Baughman** W y **Farley** MM. Invasive group B streptococcal disease: The emergence of serotype V. *Journal of Infectious Diseases* 173: 365-373, 1996.

3 **Kogan** G, **Uhrin** D, **Brisson** J-R, **Paoletti** LC, **Blodgett** AE, **Kasper** DL y **Jennings** HJ. Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B Streptococcus capsular polysaccharide. *The Journal of Biological Chemistry* 271:8786-8790, 1996.

4 **Rubens** CE, **Raff** HV, **Jackson** CJ, **Chi** EY, **Bielitzki** JT y **Hillier** SL. Pathophysiology and histopathology of group B streptococcal sepsis in *Macaca nemestrina* primates induced after intraamniotic inoculation: evidence for bacterial cellular invasion. *Journal of Infectious Diseases* 164:320-330, 1991.

5 **Nagano** Y, **Nagano** N, **Takahashi** S, **Murono** K, **Fujita** K, **Taguchi** F y **Okuwaki** Y. Restriction endonuclease digest patterns of chromosomal DNA from group B b-haemolytic streptococci. *Journal of Medical Microbiology* 35: 297-303, 1991.

6 **Takahashi** S, **Adderson** EE, **Nagano** Y, **Nagano** N, **Briesacher** MR y **Bohnsack** JF. Identification of a highly encapsulated, genetically related group of invasive type III group B streptococci. *The Journal of Infectious Diseases* 177:1116-1119, 1998.

7 **Lisitsyn** N, **Lisitsyn** N y **Wigler** M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259:946-951, 1993.

8 **Rubens** CE, **Smith** S, **Hulse** M, **Chi** EY y van **Belle** G. Respiratory epithelial cell invasion by group B streptococci. *Infection & Immunity* 60:5157-63, 1992.

9 **Tamura** GS, **Kuypers** JM, **Smith** S, **Raff** H y **Rubens** CE. Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infection and Immunity* 62:2450-8, 1994.

10 **Nizet** V, **Kim** KS, **Stins** M, **Jonas** M, **Chi** EY, **Nguyen** D y **Rubens** CE. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. *Infection and Immunity* 65:5074-5081, 1997.

11 **Gibson** RL, **Lee** MK, **Soderland** C, **Chi** EY y **Rubens** CE. Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion. *Infection & Immunity* 61:478-85, 1993.

12 **Gravekamp** C, **Kasper** DL, **Michel** JL, **Kling** DE, **Carey** V y **Madoff** LC. Immunogenicity and protective efficacy of the alpha C protein of group B streptococci are inversely related to the number of repeats. *Infection and Immunity* 65:5216-5221, 1997.

13 **Hill HR, Gonzales LA, Knappe WA, Fischer GW, Kelsey DK y Raff HV.** Comparative protective activity of human monoclonal and hyperimmune polyclonal antibody against group B streptococci. *Journal of Infectious Diseases* 163:792-797, 1991.

14 **Kim KS, Wass CA y Cross AS.** Blood-brain barrier permeability during the development of experimental bacterial meningitis in the rat. *Experimental Neurology* 145:253-257, 1997.

15 **Patti JM, Jonsson H, Guss B, Switalski LM, Wiberg K, Lindberg M y Hook M.** Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *The Journal of Biologic Chemistry* 267: 4766-4772, 1992.

16 **Yeung MK y Cisar JO.** Sequence homology between the subunits of two immunologically and functionally distinct types of fimbriae of *Actinomyces* spp. *The Journal of Bacteriology* 172:2462-8, 1990.

17 **Li T, Johansson I, Hay DI y Stromberg N.** Strains of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces viscosus* exhibit structurally variant fimbrial subunit proteins and bind to different peptide motifs in salivary proteins. *Infection and Immunity* 67:2053-2059, 1999.

18 **Jaffe J, Natanson-Yaron S, Caparon MG y Hanski E.** Protein F2, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, possesses two binding domains. *Molecular Microbiology* 21:2720-728, 1996.

19 **Rocha CL y Fischetti VA.** Identification and characterization of a novel fibronectin-binding protein on the surface of Group A streptococci. *Infection and Immunity* 66:1482-1491, 1999.

20 **Schneewind O, Jones KF y Fischetti VA.** Sequence and structural characteristics of the trypsin-resistant T6 protein of group A streptococci. *The Journal of Bacteriology* 172:3310-7, 1990.

21 **St. Geme III JW, Cutter D y Barenkamp SJ.** Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *The Journal of Bacteriology* 178:6281-6287, 1996.

22 **Barenkamp SJ y Leininger E.** Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity* 60:1302-1313, 1992.

23 **Micheils T, Wattiau P, Brasseur R, Ruyschaert JM y Cornelis G.** Secretion of Yop proteins by Yersiniae. *Infection and Immunity* 58:2840-2849, 1990.

24 **Gaillard JL, Berche P, Frehel C, Gouin E y Cossart P.** Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65:1127-1141, 1991.

25 **Madoff LC, Michel JL, Gong EW, Rodewald AK y Kasper DL.** Protection of neonatal mice from group B streptococcal infection by maternal immunization with beta C protein. *Infection and Immunity* 60:4989-4994, 1992.

26 **Stalhammar-Carlemalm M, Stenberg L y Lindahl G.** Protein Rib: A novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *The Journal of Experimental Medicine* 177:1593-1603, 1993.

27 **Ferrieri P y Flores AE.** Surface protein expression in group B streptococcal invasive isolates. *Advances in Experimental Medicine* 418:635-637, 1997.

28 **Madoff LC, Michel JT, Gong EW, Kling DE y Kasper DL.** Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 93:4131-4136, 1996.

29 **Baker CJ, Rench MA y Edwards MS.** Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B Streptococcus. *New England Journal of Medicine* 319:1180-1185, 1998.

30 **Baker CJ, Paoletti LC, Wessels MR, Guttormsen H-K, Rench MA, Hickman ME y Kasper DL.** Safety and immunogenicity of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines for group B streptococcal types Ia and Ib. *The Journal of Infectious Diseases* 179:142-150, 1999.

31 **Decker MD, Edwards KM, Bradley R y Palmer P.** Comparative trial in infants of four conjugate *Haemophilus influenzae* type b vaccines. *The Journal of Pediatrics* 120:184-189, 1992.

32 **Schlesinger Y, Granoff DM y Group TVS.** Avidity and bactericidal activity of antibody elicited by different *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Journal of the American Medical Association* 267:1489-1494, 1992.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido EmaA estreptocócico aislado que comprende la SEC. ID. nº: 2 y análogos sustancialmente homólogos, variantes alélicas y fragmentos inmunógenos de las mismas, en el que el análogo sustancialmente homólogo comparte por lo menos el 70% de identidad de secuencia con la SEC. ID. nº: 2.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, marcado con un marcador detectable.
- 10 3. Vacuna o composición inmunógena que comprende un polipéptido según la reivindicación 1, y un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
4. Vacuna o composición inmunógena según la reivindicación 3, que comprende además por lo menos un antígeno seleccionado de entre:
15 a. polipéptido Spb1 o un fragmento inmunógeno del mismo;
 b. polipéptido Spb2 o un fragmento inmunógeno del mismo;
20 c. polipéptido antígeno alfa de la proteína C o un fragmento inmunógeno del mismo;
 d. polipéptido Rib o un fragmento inmunógeno del mismo;
 e. polipéptido Lmb o un fragmento inmunógeno del mismo;
25 f. polipéptido C5a-asa o un fragmento inmunógeno del mismo;
 g. polisacáridos u oligosacáridos estreptocócicos del Grupo B.
- 30 5. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido según la reivindicación 1, y un portador farmacéuticamente aceptable.
6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, que comprende además un ingrediente activo seleccionado de entre:
35 a. los polipéptidos Spb1 y Spb2;
 b. el antígeno alfa de la proteína C;
40 c. el polipéptido Rib;
 d. el polipéptido Lmb;
 e. el polipéptido C5a-asa;
45 f. un polisacárido u oligosacárido estreptocócico del Grupo B; y
 g. una vacuna antiestreptocócica.
- 50 7. Anticuerpo purificado contra un polipéptido según la reivindicación 1.
8. Anticuerpo monoclonal contra un polipéptido según la reivindicación 1.
9. Estirpe celular inmortal que produce un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 8.
- 55 10. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9 marcado con un marcador detectable.
11. Anticuerpo según la reivindicación 10, en el que el marcador se selecciona de entre una enzima, un producto químico que emite fluorescencia y un elemento radioactivo.
- 60 12. Composición farmacéutica que comprende uno o más anticuerpos contra un polipéptido según la reivindicación 1, y un portador farmacéuticamente aceptable.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, que comprende además un anticuerpo contra una proteína seleccionada de entre Spb1, Spb2, Rib, Lmb, C5a-asa y antígeno alfa con proteína C.
- 65 14. Ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido según la reivindicación 1.

15. Ácido nucleico según la reivindicación 14, en el que el ácido nucleico se selecciona de entre:

a. la secuencia de ADN de SEC. ID. nº: 1.

b. una secuencia de ADN que se hibrida con la secuencia de ADN de SEC. ID. nº: 1 en condiciones de hibridación de severidad moderada;

c. una secuencia de ADN capaz de codificar por lo menos una de las secuencias de aminoácidos codificada por una secuencia de ADN de (a) o (b);

d. una variante degenerada de la misma;

e. un alelo de la misma; y

f. un fragmento de la misma que se hibrida con la secuencia de ADN de SEC. ID. nº: 1 en condiciones de hibridación normales.

16. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 14 y un activador.

17. Vector según la reivindicación 16, en el que el activador comprende un activador bacteriano, de levadura, de insecto o de mamífero.

18. Vector según la reivindicación 16 ó 17, en el que el vector es un plásmido, un cósmido, un cromosoma artificial de levadura (YAC), un bacteriófago o un ADN vírico eucariótico.

19. Sistema de vector huésped para la producción de un polipéptido que comprende el vector según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 en una célula huésped adecuada.

20. Sistema de vector huésped según la reivindicación 19, en el que la célula huésped adecuada comprende una célula procariótica o eucariótica.

21. Molécula de ADN recombinante que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 14.

22. Molécula de ADN recombinante según la reivindicación 21, en la que la molécula de ADN está operativamente ligada a una secuencia de control de expresión.

23. Huésped unicelular transformado con una molécula de ADN recombinante según la reivindicación 21 ó 22.

24. Vacuna de ácido nucleico que comprende la molécula de ADN recombinante según la reivindicación 21 ó 22.

25. Procedimiento para detectar la presencia de un polipéptido según la reivindicación 1, en el que el polipéptido se mide mediante:

a. puesta en contacto de una muestra en la que se supone la presencia o actividad del polipéptido, con un anticuerpo contra dicho polipéptido en condiciones que permitan que se produzca la unión del polipéptido con el anticuerpo; y

b. detección de si se ha producido la unión entre el polipéptido procedente de la muestra y el anticuerpo;

en el que la detección de la unión indica la presencia o actividad del polipéptido en la muestra.

26. Procedimiento para detectar la presencia de una bacteria que presenta un gen que codifica un polipéptido según la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento:

a. poner en contacto una muestra, en la que se supone la presencia o actividad de la bacteria, con un oligonucleótido que se hibrida con el gen del polipéptido, en condiciones que permiten que se produzca la hibridación específica del oligonucleótido con el gen; y

b. detectar si se ha producido la hibridación entre el oligonucleótido y el gen;

en el que la detección de la hibridación indica la presencia o actividad de la bacteria en la muestra.

27. Utilización de la vacuna o composición inmunógena de la reivindicación 3 ó 4, en la preparación de un medicamento destinado a la prevención de una infección con una bacteria que expresa un polipéptido según la reivindicación 1.

ES 2 286 133 T3

28. Utilización de la composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5, 6, 12 ó 13, en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de una infección con una bacteria que expresa un polipéptido según la reivindicación 1.

5 29. Utilización de la composición farmacéutica según la reivindicación 5 ó 6, en la preparación de un medicamento destinado a la provocación de una respuesta inmunitaria en un objeto que ha sido expuesto o infectado con una bacteria estreptocócica.

10 30. Utilización de la composición farmacéutica según la reivindicación 12 ó 13, en la preparación de un medicamento destinado a la prevención de una infección por una bacteria estreptocócica.

15

20

25

30

35

40

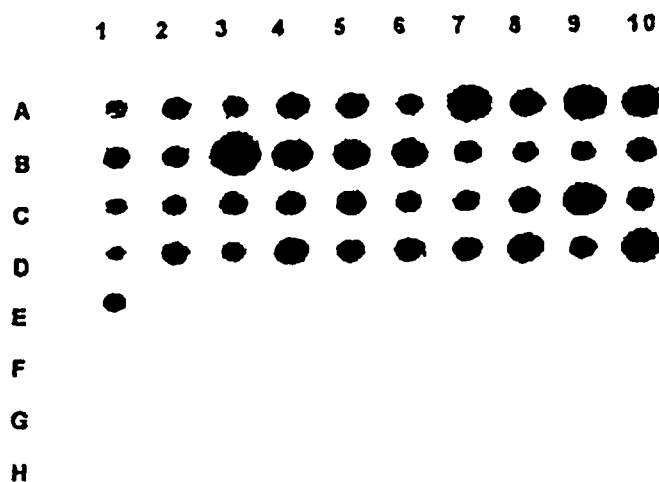
45

50

55

60

65



La figura 1. Sondas específicas de tipo III-3 del RDP. Hibridación por transferencia de manchas de la sonda DY1-1 con ADN genómico aislado de GBS de tipo III. 10 µg de ADN genómico de cada una de las 62 cepas de GBS de tipo III se transfirió a una membrana de nilón. La sonda DY1-1 radiomarcada se hibridó con ADN de todas las cepas III-3 (filas A-D) incluyendo la cepa de tipo III-3 original (pocillo E-1). La sonda no pudo hibridarse con el ADN de las cepas III-2 (F1-F10, G1-7) incluyendo la cepa original utilizada en la hibridación por substracción (pocillo E 10) y las cepas III-1 (pocillos H1-3; véase la Figura 3). El mismo modelo de hibridación se observó utilizando la sonda DY1-11.

FIGURA 1

ES 2 286 133 T3

EmaA

atg acc ctt gtt aaa aat caa gat gct ctt gat aaa gct act gca aat	48
Met Thr Leu Val Lys Asn Gln Asp Ala Leu Asp Lys Ala Thr Ala Asn	
1 5 10 15	
aca gat gat gcg gca ttt ttg gaa att cca gtt gca tca act att aat	96
Thr Asp Asp Ala Ala Phe Leu Glu Ile Pro Val Ala Ser Thr Ile Asn	
20 25 30	
gaa aaa gca gtt tta gga aaa gca att gaa aat act ttt gaa ctt caa	144
Glu Lys Ala Val Leu Gly Lys Ala Ile Glu Asn Thr Phe Glu Leu Gln	
35 40 45	
tat gac cat act cct gat aaa gct gac aat cca aaa cca tct aat cct	192
Tyr Asp His Thr Pro Asp Lys Ala Asp Asn Pro Lys Pro Ser Asn Pro	
50 55 60	
cca aga aaa cca gaa gtt cat act ggt ggg aaa cga ttt gta aag aaa	240
Pro Arg Lys Pro Glu Val His Thr Gly Gly Lys Arg Phe Val Lys Lys	
65 70 75 80	
gac tca aca gaa aca caa aca cta ggt ggt gct gag ttt gat ttg ttg	288
Asp Ser Thr Glu Thr Gln Thr Leu Gly Gly Ala Glu Phe Asp Leu Leu	
85 90 95	
gct tct gat ggg aca gca gta aaa tgg aca gat gct ctt att aaa gcg	336
Ala Ser Asp Gly Thr Ala Val Lys Trp Thr Asp Ala Leu Ile Lys Ala	
100 105 110	
aat act aat aaa aac tat att gct gga gaa gct gtt act ggg caa cca	384
Asn Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Ala Gly Glu Ala Val Thr Gly Gln Pro	
115 120 125	
atc aaa ttg aaa tca cat aca gac ggt acg ttt gag att aaa ggt ttg	432
Ile Lys Leu Lys Ser His Thr Asp Gly Thr Phe Glu Ile Lys Gly Leu	
130 135 140	
gct tat gca gtt gat gcg aat gca gag ggt aca gca gta act tac aaa	480
Ala Tyr Ala Val Asp Ala Asn Ala Glu Gly Thr Ala Val Thr Tyr Lys	
145 150 155 160	
tta aaa gaa aca aaa gca cca gaa ggt tat gta atc cct gat aaa gaa	528
Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro Glu Gly Tyr Val Ile Pro Asp Lys Glu	
165 170 175	
atc gag ttt aca gta tca caa aca tct tat aat aca aaa cca act gac	576
Ile Glu Phe Thr Val Ser Gln Thr Ser Tyr Asn Thr Lys Pro Thr Asp	
180 185 190	
atc acg gtt gat agt gct gat gca aca cct gat aca att aaa aac aac	624
Ile Thr Val Asp Ser Ala Asp Ala Thr Pro Asp Thr Ile Lys Asn Asn	
195 200 205	
aaa cgt cct tca atc cct aat act ggt ggt att ggt acg gct atc ttt	672
Lys Arg Pro Ser Ile Pro Asn Thr Gly Gly Ile Gly Thr Ala Ile Phe	
210 215 220	
gtc gct atc ggt gct gcg gtg atg gct ttt gct gtt aag ggg atg aag	720
Val Ala Ile Gly Ala Ala Val Met Ala Phe Ala Val Lys Gly Met Lys	
225 230 235 240	
cgt cgt aca aaa gat aac taa	738
Arg Arg Thr Lys Asp Asn	
245	

FIGURA 2

ES 2 286 133 T3

EmaB

atg aaa caa aca tta aaa ctt atg ttt tct ttt ctg ttg atg tta ggg	48
Met Lys Gln Thr Leu Lys Leu Met Phe Ser Phe Leu Leu Met Leu Gly	
1 5 10 15	
act atg ttt gga att agc caa act gtt tta gcg caa gaa act cat cag	96
Thr Met Phe Gly Ile Ser Gln Thr Val Leu Ala Gln Glu Thr His Gln	
20 25 30	
ttg acg att gtt cat ctt gaa gca agg gat att gat cgt cca aat cca	144
Leu Thr Ile Val His Leu Glu Ala Arg Asp Ile Asp Arg Pro Asn Pro	
35 40 45	
cag ttg gag att gcc cct aaa gaa ggg act cca att gaa gga gta ctc	192
Gln Leu Glu Ile Ala Pro Lys Glu Gly Thr Pro Ile Glu Gly Val Leu	
50 55 60	
tat cag ttg tac caa tta aaa tca act gaa gat ggc gat ttg ttg gca	240
Tyr Gln Leu Tyr Gln Leu Lys Ser Thr Glu Asp Gly Asp Leu Leu Ala	
65 70 75 80	
cat tgg aat tcc cta act atc aca gaa ttg aaa aaa cag gcg cag cag	288
His Trp Asn Ser Leu Thr Ile Thr Glu Leu Lys Lys Gln Ala Gln Gln	
85 90 95	
gtt ttt gaa gcc act act aat caa caa gga aag gct aca ttt aac caa	336
Val Phe Glu Ala Thr Thr Asn Gln Gln Gly Lys Ala Thr Phe Asn Gln	
100 105 110	
cta cca gat gga att tat tat ggt ctg gcg gtt aaa gcc ggt gaa aaa	384
Leu Pro Asp Gly Ile Tyr Tyr Gly Leu Ala Val Lys Ala Gly Glu Lys	
115 120 125	
aat cgt aat gtc tca gct ttc ttg gtt gac ttg tct gag gat aaa gtg	432
Asn Arg Asn Val Ser Ala Phe Leu Val Asp Leu Ser Glu Asp Lys Val	
130 135 140	
att tat cct aaa atc atc tgg tcc aca ggt gag ttg gac ttg ctt aaa	480
Ile Tyr Pro Lys Ile Ile Trp Ser Thr Gly Glu Leu Asp Leu Leu Lys	
145 150 155 160	
gtt ggt gtg gat ggt gat acc aaa aaa cca cta gca ggc gtt gtc ttt	528
Val Gly Val Asp Gly Asp Thr Lys Lys Pro Leu Ala Gly Val Val Phe	
165 170 175	
gaa ctt tat gaa aag aat ggt agg act cct att cgt gtg aaa aat ggg	576
Glu Leu Tyr Glu Lys Asn Gly Arg Thr Pro Ile Arg Val Lys Asn Gly	
180 185 190	
gtg cat tct caa gat att gac gct gca aaa cat tta gaa aca gat tca	624
Val His Ser Gln Asp Ile Asp Ala Ala Lys His Leu Glu Thr Asp Ser	
195 200 205	
tca ggg cat atc aga att tcc ggg ctc atc cat ggg gac tat gtc tta	672
Ser Gly His Ile Arg Ile Ser Gly Leu Ile His Gly Asp Tyr Val Leu	
210 215 220	
aaa gaa atc gag aca cag tca gga tat cag atc gga cag gca gag act	720
Lys Glu Ile Glu Thr Gln Ser Gly Tyr Gln Ile Gly Gln Ala Glu Thr	
225 230 235 240	
gct gtg act att gaa aaa tca aaa aca gta aca gta acg att gaa aat	768
Ala Val Thr Ile Glu Lys Ser Lys Thr Val Thr Val Thr Ile Glu Asn	
245 250 255	
aaa aaa gtt ccg aca cct aaa gtg cca tct cga gga ggt ctt att ccc	816
Lys Lys Val Pro Thr Pro Lys Val Pro Ser Arg Gly Gly Leu Ile Pro	
260 265 270	

FIGURA 3A

ES 2 286 133 T3

aaa	aca	ggt	gag	caa	cag	gca	atg	gca	ctt	gta	att	att	ggt	ggt	att	864
Lys	Thr	Gly	Glu	Gln	Gln	Ala	Met	Ala	Leu	Val	Ile	Ile	Gly	Gly	Ile	
		275					280					285				
tta	att	gct	tta	gcc	tta	cga	tta	cta	tca	aaa	cat	cgg	aaa	cat	caa	912
Leu	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Ser	Lys	His	Arg	Lys	His	Gln	
		290				295					300					
aat	aag	gat	tag													924
Asn	Lys	Asp														
305																

FIGURA 3B

ES 2 286 133 T3

EmaC			
atg gga caa aaa tca aaa ata tct cta gct acg aat att cgt ata tgg	48		
Met Gly Gln Lys Ser Lys Ile Ser Leu Ala Thr Asn Ile Arg Ile Trp			
1 5 10 15			
att ttt cgt tta att ttc tta gcg ggt ttc ctt gtt ttg gca ttc ccc	96		
Ile Phe Arg Leu Ile Phe Leu Ala Gly Phe Leu Val Leu Ala Phe Pro			
20 25 30			
atc gtt agt cag gtc atg tac ttt caa gcc tct cac gcc aat att aat	144		
Ile Val Ser Gln Val Met Tyr Phe Gln Ala Ser His Ala Asn Ile Asn			
35 40 45			
gct tct aaa gaa gct gtt acc aag att gac cgg gtg gag att aat cgg	192		
Ala Phe Lys Glu Ala Val Thr Lys Ile Asp Arg Val Glu Ile Asn Arg			
50 55 60			
cgt tta gaa ctt gct tat gct tat aac gcc agt ata gca ggt gcc aaa	240		
Arg Leu Glu Leu Ala Tyr Ala Tyr Asn Ala Ser Ile Ala Gly Ala Lys			
65 70 75 80			
act aat ggc gaa tat cca gcg ctt aaa gac ccc tac tct gct gaa caa	288		
Thr Asn Gly Glu Tyr Pro Ala Leu Lys Asp Pro Tyr Ser Ala Glu Gln			
85 90 95			
aag cag gca ggg gtc gtt gag tac gcc cgc atg gtt gaa gtc aaa gaa	336		
Lys Gln Ala Gly Val Val Glu Tyr Ala Arg Met Leu Glu Val Lys Glu			
100 105 110			
caa ata ggt cat gtg att att cca aga att aat cag gat atc cct att	384		
Gln Ile Gly His Val Ile Ile Pro Arg Ile Asn Gln Asp Ile Pro Ile			
115 120 125			
tac gct ggc tct gct gaa gaa aat ctt cag agg ggc gtt gga cat tta	432		
Tyr Ala Gly Ser Ala Glu Glu Asn Leu Gln Arg Gly Val Gly His Leu			
130 135 140			
gag ggg acc agt ctt cca gtc ggt ggt gag tca act cat gcc gtt cta	480		
Glu Gly Thr Ser Leu Pro Val Gly Gly Glu Ser Thr His Ala Val Leu			
145 150 155 160			
act gcc cat cga ggg cta cca acg gcc aag cta ttt acc aat tta gac	528		
Thr Ala His Arg Gly Leu Pro Thr Ala Lys Leu Phe Thr Asn Leu Asp			
165 170 175			
aag gta aca gta ggt gac cgt ttt tac att gaa cac atc ggc gga aag	576		
Lys Val Thr Val Gly Asp Arg Phe Tyr Ile Glu His Ile Gly Gly Lys			
180 185 190			
att gct tat cag gta gac caa atc aaa gtt atc gcc cct gat cag tta	624		
Ile Ala Tyr Gln Val Asp Gln Ile Lys Val Ile Ala Pro Asp Gln Leu			
195 200 205			
gag gat ttg tac gtg att caa gga gaa gat cac gtc acc cta tta act	672		
Glu Asp Leu Tyr Val Ile Gln Gly Glu Asp His Val Thr Leu Leu Thr			
210 215 220			
tgc aca cct tat atg ata aat agt cat cgc ctc ctc gtt cga ggc aag	720		
Cys Thr Pro Tyr Met Ile Asn Ser His Arg Leu Leu Val Arg Gly Lys			
225 230 235 240			
cga att cct tat gtg gaa aaa aca gtg cag aaa gat tca aag acc ttc	768		
Arg Ile Pro Tyr Val Glu Lys Thr Val Gln Lys Asp Ser Lys Thr Phe			
245 250 255			
agg caa caa caa tac cta acc tat gct atg tgg gta gtc gtt gga ctt	816		
Arg Gln Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Ala Met Trp Val Val Val Gly Leu			
260 265 270			
atc ttg ctg tgg ctt ctc att tgg ttt aaa aag acg aaa cag aaa aag	864		
Ile Leu Leu Ser Leu Leu Ile Trp Phe Lys Lys Thr Lys Gln Lys Lys			
275 280 285			
cgg aga aag aat gaa aaa gcg gct agt caa aat agt cac aat aat tgg	912		
Arg Arg Lys Asn Glu Lys Ala Ala Ser Gln Asn Ser His Asn Asn Ser			
290 295 300			
aaa taa	918		
Lys			
305			

FIGURA 4

ES 2 286 133 T3

EnaD

```

atg aaa aag cgg cta gtc aaa ata gtc aca ata att cga aat aat aaa 48
Met Lys Lys Arg Leu Val Lys Ile Val Thr Ile Ile Arg Asn Asn Lys
1 5 10 15

atc aga acc ctc att ttt gtg atg gga agt ctg att ctc tta ttt ccg 96
Ile Arg Thr Leu Ile Phe Val Met Gly Ser Leu Ile Leu Leu Phe Pro
20 25 30

att gtg agc cag gta agt tac tac ctt gct tgc cat caa aat att aat 144
Ile Val Ser Gln Val Ser Tyr Tyr Leu Ala Ser His Gln Asn Ile Asn
35 40 45

caa ttt aag cgg gaa gtc gct aag att gat act aat acg gtt gaa cga 192
Gln Phe Lys Arg Glu Val Ala Lys Ile Asp Thr Asn Thr Val Glu Arg
50 55 60

cgc atc gct tta gct aat gct tac aat gag acg tta tca agg aat ccc 240
Arg Ile Ala Leu Ala Asn Ala Tyr Asn Glu Thr Leu Ser Arg Asn Pro
65 70 75 80

ttg ctt ata gac cct ttt acc agt aag caa aaa gaa ggt ttg aga gag 288
Leu Leu Ile Asp Pro Phe Thr Ser Lys Gln Lys Glu Gly Leu Arg Glu
85 90 95

tat gct cgt atg ctt gaa gtt cat gag caa ata ggt cat gtg gca atc 336
Tyr Ala Arg Met Leu Glu Val His Glu Gln Ile Gly His Val Ala Ile
100 105 110

cca agt att ggg gtt gat att cca att tat gct gga aca tcc gaa act 384
Pro Ser Ile Gly Val Asp Ile Pro Ile Tyr Ala Gly Thr Ser Glu Thr
115 120 125

gtg ctt cag aaa ggt agt ggg cat ttg gag gga acc agt ctt cca gtg 432
Val Leu Gln Lys Gly Ser Gly His Leu Glu Gly Thr Ser Leu Pro Val
130 135 140

gga ggt ttg tca acc cat tca gta cta act gcc cac cgt ggc ttg cca 480
Gly Gly Leu Ser Thr His Ser Val Leu Thr Ala His Arg Gly Leu Pro
145 150 155 160

aca gct agg cta ttt acc gac tta aat aaa gtt aaa aaa ggc cag att 528
Thr Ala Arg Leu Phe Thr Asp Leu Asn Lys Val Lys Lys Gly Gln Ile
165 170 175

ttc tat gtg acg aac atc aag gaa aca ctt gcc tac aaa gtc gtg tct 576
Phe Tyr Val Thr Asn Ile Lys Glu Thr Leu Ala Tyr Lys Val Val Ser
180 185 190

atc aaa gtt gtg gat cca aca gct tta agt gag gtt aag att gtc aat 624
Ile Lys Val Val Asp Pro Thr Ala Leu Ser Glu Val Lys Ile Val Asn
195 200 205

ggg aag gat tat ata acc ttg ctg act tgc aca cct tac atg atc aat 672
Gly Lys Asp Tyr Ile Thr Leu Leu Thr Cys Thr Pro Tyr Met Ile Asn
210 215 220

agt cat cgt ctc ttg gta aaa gga gag cgt att cct tat gat tct acc 720
Ser His Arg Leu Leu Val Lys Gly Glu Arg Ile Pro Tyr Asp Ser Thr
225 230 235 240

gag gcg gaa aag cac aaa gaa caa acc gta caa gat tat cgt ttg tca 768
Glu Ala Glu Lys His Lys Glu Gln Thr Val Gln Asp Tyr Arg Leu Ser
245 250 255

cta gtg ttg aag ata cta cta gta tta tta att gga ctc ttc atc gtg 816
Leu Val Leu Lys Ile Leu Leu Val Leu Leu Ile Gly Leu Phe Ile Val
260 265 270

ata atg atg aga aga tgg atg caa cat cgt caa taa 852
Ile Met Met Arg Arg Trp Met Gln His Arg Gln

```

125

180

ES 2 286 133 T3

EmaE

atg atg att gtg aat aat ggt tat cta gaa ggg aga aaa atg aaa aag	48
Met Met Ile Val Asn Asn Gly Tyr Leu Glu Gly Arg Lys Met Lys Lys	
1 5 10 15	
aga caa aaa ata tgg aga ggg tta tca gtt act tta cta atc ctg tcc	96
Arg Gln Lys Ile Trp Arg Gly Leu Ser Val Thr Leu Leu Ile Leu Ser	
20 25 30	
caa att cca ttt ggt ata ttg gta caa ggt gaa acc caa gat acc aat	144
Gln Ile Pro Phe Gly Ile Leu Val Gln Gly Glu Thr Gln Asp Thr Asn	
35 40 45	
caa gca ctt gga aaa gta att gtt aaa aaa acg gga gac aat gct aca	192
Gln Ala Leu Gly Lys Val Ile Val Lys Lys Thr Gly Asp Asn Ala Thr	
50 55 60	
cca tta ggc aaa gcg act ttt gtg tta aaa aat gac aat gat aag tca	240
Pro Leu Gly Lys Ala Thr Phe Val Leu Lys Asn Asp Asn Asp Lys Ser	
65 70 75 80	
gaa aca agt cac gaa acg gta gag ggt tct gga gaa gca acc ttt gaa	288
Glu Thr Ser His Thr Val Glu Gly Ser Gly Glu Ala Thr Phe Glu	
85 90 95	
aac ata aaa cct gga gac tac aca tta aga gaa gaa aca gca cca att	336
Asn Ile Lys Pro Gly Asp Tyr Thr Leu Arg Glu Glu Thr Ala Pro Ile	
100 105 110	
ggt tat aaa aaa act gat aaa acc tgg aaa gtt aaa gtt gca gat aac	384
Gly Tyr Lys Lys Thr Asp Lys Thr Trp Lys Val Lys Val Ala Asp Asn	
115 120 125	
gga gca aca ata atc gag ggt atg gat gca gat aaa gca gag aaa cga	432
Gly Ala Thr Ile Ile Glu Gly Met Asp Ala Asp Lys Ala Glu Lys Arg	
130 135 140	
aaa gaa gtt ttg aat gcc caa tat cca aaa tca gct att tat gag gat	480
Lys Glu Val Leu Asn Ala Gln Tyr Pro Lys Ser Ala Ile Tyr Glu Asp	
145 150 155 160	
aca aaa gaa aat tac cca tta gtt aat gta gag ggt tcc aaa gtt ggt	528
Thr Lys Glu Asn Tyr Pro Leu Val Asn Val Glu Gly Ser Lys Val Gly	
165 170 175	
gaa caa tac aaa gca ttg aat cca ata aat gga aaa gat ggt cga aga	576
Glu Gln Tyr Lys Ala Leu Asn Pro Ile Asn Gly Lys Asp Gly Arg Arg	
180 185 190	
gag att gct gaa ggt tgg tta tca aaa aaa aat aca ggg gtc aat gat	624
Glu Ile Ala Glu Gly Trp Leu Ser Lys Lys Asn Thr Gly Val Asn Asp	
195 200 205	
ctc gat aag aat aaa tat aaa att gaa tta act gtt gag ggt aaa acc	672
Leu Asp Lys Asn Lys Tyr Lys Ile Glu Leu Thr Val Glu Gly Lys Thr	
210 215 220	
act gtt gaa acg aaa gaa ctt aat caa cca cta gat gtc gtt gtg cta	720
Thr Val Glu Thr Lys Glu Leu Asn Gln Pro Leu Asp Val Val Val Leu	
225 230 235 240	
tta gat aat tca aat agt atg aat aat gaa aga gcc aat aat tct caa	768
Leu Asp Asn Ser Asn Ser Met Asn Asn Glu Arg Ala Asn Asn Ser Gln	
245 250 255	
aga gca tta aaa gct ggg gaa gca gtt gaa aag ctg att gat aaa att	816
Arg Ala Leu Lys Ala Gly Glu Ala Val Glu Lys Leu Ile Asp Lys Ile	
260 265 270	
aca tca aat aaa gac aat aga gta gct ctt gtg aca tat gcc tca acc	864
Thr Ser Asn Lys Asp Asn Arg Val Ala Leu Val Thr Tyr Ala Ser Thr	

FIGURA 6A

ES 2 286 133 T3

275	280	285	
att ttt gat ggt act gaa gcg acc gta tca aag gga gtt gcc gat caa Ile Phe Asp Gly Thr Glu Ala Thr Val Ser Lys Gly Val Ala Asp Gln 290 295 300			912
aat ggt aaa gcg ctg aat gat agt gta tca tgg gat tat cat aaa act Asn Gly Lys Ala Leu Asn Asp Ser Val Ser Trp Asp Tyr His Lys Thr 305 310 315 320			960
act ttt aca gca act aca cat aat tac agt tat tta aat tta aca aat Thr Phe Thr Ala Thr His Asn Tyr Ser Tyr Leu Asn Leu Thr Asn 325 330 335			1008
gat gct aac gaa gtt aat att cta aag tca aga att cca aag gaa gcg Asp Ala Asn Glu Val Asn Ile Leu Lys Ser Arg Ile Pro Lys Glu Ala 340 345 350			1056
gag cat ata aat ggg gat cgc acg ctc tat caa ttt ggt gcg aca ttt Glu His Ile Asn Gly Asp Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gly Ala Thr Phe 355 360 365			1104
act caa aaa gct cta atg aaa gca aat gaa att tta gag aca caa agt Thr Gln Lys Ala Leu Met Lys Ala Asn Glu Ile Leu Glu Thr Gln Ser 370 375 380			1152
tct aat gct aga aaa aaa ctt att ttt cac gta act gat ggt gtc cct Ser Asn Ala Arg Lys Lys Leu Ile Phe His Val Thr Asp Gly Val Pro 385 390 395 400			1200
acg atg tct tat gcc ata aat ttt aat cct tat ata tca aca tct tac Thr Met Ser Tyr Ala Ile Asn Phe Asn Pro Tyr Ile Ser Thr Ser Tyr 405 410 415			1248
caa aac cag ttt aat tct ttt tta aat aaa ata cca gat aga agt ggt Gln Asn Gln Phe Asn Ser Phe Leu Asn Lys Ile Pro Asp Arg Ser Gly 420 425 430			1296
att ctc caa gag gat ttt ata atc aat ggt gat gat tat caa ata gta Ile Leu Gln Glu Asp Phe Ile Ile Asn Gly Asp Asp Tyr Gln Ile Val 435 440 445			1344
aaa gga gat gga gag agt ttt aaa ctg ttt tcg gat aga aaa gtt cct Lys Gly Asp Gly Glu Ser Phe Lys Leu Phe Ser Asp Arg Lys Val Pro 450 455 460			1392
gtt act gga gga acg aca caa gca gct tat cga gta ccg caa aat caa Val Thr Gly Gly Thr Thr Gln Ala Ala Tyr Arg Val Pro Gln Asn Gln 465 470 475 480			1440
ctc tct gta atg agt aat gag gga tat gca att aat agt gga tat att Leu Ser Val Met Ser Asn Glu Gly Tyr Ala Ile Asn Ser Gly Tyr Ile 485 490 495			1488
tat ctc tat tgg aga gat tac aac tgg gtc tat cca ttt gat cct aag Tyr Leu Tyr Trp Arg Asp Tyr Asn Trp Val Tyr Pro Phe Asp Pro Lys 500 505 510			1536
aca aag aaa gtt tct gca acg aaa caa atc aaa act cat ggt gag cca Thr Lys Lys Val Ser Ala Thr Lys Gln Ile Lys Thr His Gly Glu Pro 515 520 525			1584
aca aca tta tac ttt aat gga aat ata aga cct aaa ggt tat gac att Thr Thr Leu Tyr Phe Asn Gly Asn Ile Arg Pro Lys Gly Tyr Asp Ile 530 535 540			1632
ttt act gtt ggg att ggt gta aac gga gat cct ggt gca act cct ctt Phe Thr Val Gly Ile Gly Val Asn Gly Asp Pro Gly Ala Thr Pro Leu 545 550 555 560			1680
gaa gct gag aaa ttt atg caa tca ata tca agt aaa aca gaa aat tat			1728

FIGURA 6B

ES 2 286 133 T3

Glu Ala Glu Lys Phe Met Gln Ser Ile Ser Ser Lys Thr Glu Asn Tyr	
565 570 575	
act aat gtt gat gat aca aat aaa att tat gat gag cta aat aaa tac	1776
Thr Asn Val Asp Asp Thr Asn Lys Ile Tyr Asp Glu Leu Asn Lys Tyr	
580 585 590	
ttt aaa aca att gtt gag gaa aaa cat tct att gtt gat gga aat gtg	1824
Phe Lys Thr Ile Val Glu Glu Lys His Ser Ile Val Asp Gly Asn Val	
595 600 605	
act gat cct atg gga gag atg att gaa ttc caa tta aaa aat ggt caa	1872
Thr Asp Pro Met Gly Glu Met Ile Glu Phe Gln Leu Lys Asn Gly Gln	
610 615 620	
agt ttt aca cat gat gat tac gtt ttg gtt gga aat gat ggc agt caa	1920
Ser Phe Thr His Asp Asp Tyr Val Leu Val Gly Asn Asp Gly Ser Gln	
625 630 635 640	
tta aaa aat ggt gtg gct ctt ggt gga cca aac agt gat ggg gga att	1968
Leu Lys Asn Gly Val Ala Leu Gly Gly Pro Asn Ser Asp Gly Gly Ile	
645 650 655	
tta aaa gat gtt aca gtg act tat gat aag aca tct caa acc atc aaa	2016
Leu Lys Asp Val Thr Val Thr Tyr Asp Lys Thr Ser Gln Thr Ile Lys	
660 665 670	
atc aat cat ttg aac tta gga agt gga caa aaa gta gtt ctt acc tat	2064
Ile Asn His Leu Asn Leu Gly Ser Gly Gln Lys Val Val Leu Thr Tyr	
675 680 685	
gat gta cgt tta aaa gat aac tat ata agt aac aaa ttt tac aat aca	2112
Asp Val Arg Leu Lys Asp Asn Tyr Ile Ser Asn Lys Phe Tyr Asn Thr	
690 695 700	
aat aat cgt aca acg cta agt ccg aag agt gaa aaa gaa cca aat act	2160
Asn Asn Arg Thr Thr Leu Ser Pro Lys Ser Glu Lys Glu Pro Asn Thr	
705 710 715 720	
att cgt gat ttc cca att ccc aaa att cgt gat gtt cgt gag ttt ccg	2208
Ile Arg Asp Phe Pro Ile Pro Lys Ile Arg Asp Val Arg Glu Phe Pro	
725 730 735	
gta cta acc atc agt aat cag aag aaa atg ggt gag gtt gaa ttt att	2256
Val Leu Thr Ile Ser Asn Gln Lys Lys Met Gly Glu Val Glu Phe Ile	
740 745 750	
aaa gtt aat aaa gac aaa cat tca gaa tcg ctt ttg gga gct aag ttt	2304
Lys Val Asn Lys Asp Lys His Ser Glu Ser Leu Leu Gly Ala Lys Phe	
755 760 765	
caa ctt cag ata gaa aaa gat ttt tct ggg tat aag caa ttt gtt cca	2352
Gln Leu Gln Ile Glu Lys Asp Phe Ser Gly Tyr Lys Gln Phe Val Pro	
770 775 780	
gag gga agt gat gtt aca aca aag aat gat ggt aaa att tat ttt aaa	2400
Glu Gly Ser Asp Val Thr Thr Lys Asn Asp Gly Lys Ile Tyr Phe Lys	
785 790 795 800	
gca ctt caa gat ggt aac tat aaa tta tat gaa att tca agt cca gat	2448
Ala Leu Gln Asp Gly Asn Tyr Lys Leu Tyr Glu Ile Ser Ser Pro Asp	
805 810 815	
ggc tat ata gag gtt aaa acg aaa cct gtt gtg aca ttt aca att caa	2496
Gly Tyr Ile Glu Val Lys Thr Lys Pro Val Val Thr Phe Thr Ile Gln	
820 825 830	
aat gga gaa gtt acg aac ctg aaa gca gat cca aat gct aat aaa aat	2544
Asn Gly Glu Val Thr Asn Leu Lys Ala Asp Pro Asn Ala Asn Lys Asn	
835 840 845	

FIGURA 6C

ES 2 286 133 T3

caa atc ggg tat ctt gaa gga aat ggt aaa cat ctt att acc aac act	2592
Gln Ile Gly Tyr Leu Glu Gly Asn Gly Lys His Leu Ile Thr Asn Thr	
850 855 860	
ccc aaa cgc cca cca ggt gtt ttt cct aaa aca ggg gga att ggt aca	2640
Pro Lys Arg Pro Pro Gly Val Phe Pro Lys Thr Gly Gly Ile Gly Thr	
865 870 875 880	
att gtc tat ata tta gtt ggt tct act ttt atg ata ctt acc att tgt	2688
Ile Val Tyr Ile Leu Val Gly Ser Thr Phe Met Ile Leu Thr Ile Cys	
885 890 895	
tct ttc cgt cgt aaa caa ttg taa	2712
Ser Phe Arg Arg Lys Gln Leu	
900	

FIGURA 6D

ES 2 286 133 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Adderson, Elisabeth
Bohnsack, John

<120> ÁCIDOS NUCLEICOS DE POLIPÉPTIDOS DE ESTREPTOCOCOS DEL GRUPO B Y COMPOSICIONES
TERAPÉUTICAS Y VACUNAS DE LOS MISMOS

<130> 2511-1-001

<140> Desconocido

<141> 2000-08-08

<160> 37

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 737

<212> ADN

<213> *Streptococcus agalactiae*

<400> 1

```
atgacccttg ttaaaaatca agatgctctt gataaagcta ctgcaaatac agatgatgcg 60
gcatttttgg aaattccagt tgcacaaact attaatgaaa aagcagtttt aggaaaagca 120
attgaaaata cttttgaact tcaatatgac catactcctg ataaagctga caatccaaaa 180
ccatctaata ctccaagaaa accagaagtt catactggtg ggaaacgatt tgtaaagaaa 240
gactcaacag aaacacaaac actaggtggt gctgagtttg atttggtggc ttctgatggg 300
acagcagtaa aatggacaga tgctcttatt aaagcgaata ctaataaaaa ctatattgct 360
ggagaagctg ttactgggca accaatcaaa ttgaaatcac atacagacgg tacgtttgag 420
attaaagggt tggcttatgc agttgatgcg aatgcagagg gtacagcagt aacttacaaa 480
ttaaaagaaa caaaagcacc agaaggttat gtaatccctg ataaagaaat cgagtttaca 540
gtatcacaaa catcttataa tacaaaacca actgacatca cggttgatag tgctgatgca 600
acacctgata caattaaaaa caacaaacgt ccttcaatcc ctaatactgg tggatttggg 660
acggctatct ttgtcgctat cggtgctgcg gtgatggctt ttgctgttaa ggggatgaag 720
catcatacaa aaataaa                                     737
```

<210> 2

<211> 245

<212> PRT

<213> *Streptococcus agalactiae*

ES 2 286 133 T3

<400> 2

5	Met Thr Leu Val Lys Asn Gln Asp Ala Leu Asp Lys Ala Thr Ala Asn	1 5 10 15
10	Thr Asp Asp Ala Ala Phe Leu Glu Ile Pro Val Ala Ser Thr Ile Asn	20 25 30
15	Glu Lys Ala Val Leu Gly Lys Ala Ile Glu Asn Thr Phe Glu Leu Gln	35 40 45
20	Tyr Asp His Thr Pro Asp Lys Ala Asp Asn Pro Lys Pro Ser Asn Pro	50 55 60
25	Pro Arg Lys Pro Glu Val His Thr Gly Gly Lys Arg Phe Val Lys Lys	65 70 75 80
30	Asp Ser Thr Glu Thr Gln Thr Leu Gly Gly Ala Glu Phe Asp Leu Leu	85 90 95
35	Ala Ser Asp Gly Thr Ala Val Lys Trp Thr Asp Ala Leu Ile Lys Ala	100 105 110
40	Asn Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Ala Gly Glu Ala Val Thr Gly Gln Pro	115 120 125
45	Ile Lys Leu Lys Ser His Thr Asp Gly Thr Phe Glu Ile Lys Gly Leu	130 135 140
50	Ala Tyr Ala Val Asp Ala Asn Ala Glu Gly Thr Ala Val Thr Tyr Lys	145 150 155 160
55	Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro Glu Gly Tyr Val Ile Pro Asp Lys Glu	165 170 175
60	Ile Glu Phe Thr Val Ser Gln Thr Ser Tyr Asn Thr Lys Pro Thr Asp	180 185 190
	Ile Thr Val Asp Ser Ala Asp Ala Thr Pro Asp Thr Ile Lys Asn Asn	195 200 205
	Lys Arg Pro Ser Ile Pro Asn Thr Gly Gly Ile Gly Thr Ala Ile Phe	210 215 220
	Val Ala Ile Gly Ala Ala Val Met Ala Phe Ala Val Lys Gly Met Lys	225 230 235 240
	Arg Arg Thr Lys Asp	245

<210> 3

<211> 924

<212> ADN

<213> *Streptococcus agalactiae*

ES 2 286 133 T3

<400> 3

```

5      atgaaacaaa cattaaaact tatgttttct tttctgttga tgttagggac tatgttttga 60
      attagccaaa ctgttttagc gcaagaaact catcagttga cgattgttca tcttgaagca 120
      agggatattg atcgtccaaa tccacagttg gagattgccc ctaaagaagg gactccaatt 180
10     gaaggagtac tctatcagtt gtaccaatta aaatcaactg aagatggcga tttgttggca 240
      catttgaatt ccctaactat cacagaattg aaaaaacagg cgcagcaggt ttttgaagcc 300
15     actactaatc aacaaggaaa ggctacattt aaccaactac cagatggaat ttattatggt 360
      ctggcggtta aagccggtga aaaaaatcgt aatgtctcag ctttcttggt tgacttgtct 420
20     gaggataaag tgatttatcc taaaatcadc tggccacag gtgagttgga cttgcttaaa 480
      gttggtgtgg atggtgatac caaaaaacca ctagcaggcg ttgtctttga actttatgaa 540
25     aagaatggta ggactcctat tcgtgtgaaa aatggggtgc attctcaaga tattgacgct 600
      gcaaaacatt tagaaacaga ttcacaggg catatcagaa tttccgggct catccatggg 660
30     gactatgtct taaaagaaat cgagacacag tcaggatadc agatcggaca ggcagagact 720
      gctgtgacta ttgaaaaatc aaaaacagta acagtaacga ttgaaaataa aaaagttccg 780
35     acacctaaag tgccatctcg aggaggtctt attcccaaaa caggtgagca acaggcaatg 840
      gcacttgtaa ttattgggtg tatttttaatt gctttagcct tacgattact atcaaaacat 900
40     cggaacatc aaaataagga ttag                                     924

```

<210> 4

<211> 307

<212> PRT

<213> *Streptococcus agalactiae*

50

55

60

65

ES 2 286 133 T3

<400> 4

5	Met	Lys	Gln	Thr	Leu	Lys	Leu	Met	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Met	Leu	Gly	1	5	10	15
10	Thr	Met	Phe	Gly	Ile	Ser	Gln	Thr	Val	Leu	Ala	Gln	Glu	Thr	His	Gln	20	25	30	
15	Leu	Thr	Ile	Val	His	Leu	Glu	Ala	Arg	Asp	Ile	Asp	Arg	Pro	Asn	Pro	35	40	45	
20	Gln	Leu	Glu	Ile	Ala	Pro	Lys	Glu	Gly	Thr	Pro	Ile	Glu	Gly	Val	Leu	50	55	60	
25	Tyr	Gln	Leu	Tyr	Gln	Leu	Lys	Ser	Thr	Glu	Asp	Gly	Asp	Leu	Leu	Ala	65	70	75	80
30	His	Trp	Asn	Ser	Leu	Thr	Ile	Thr	Glu	Leu	Lys	Lys	Gln	Ala	Gln	Gln	85	90	95	
35	Val	Phe	Glu	Ala	Thr	Thr	Asn	Gln	Gln	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe	Asn	Gln	100	105	110	
40	Leu	Pro	Asp	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Ala	Val	Lys	Ala	Gly	Glu	Lys	115	120	125	
45	Asn	Arg	Asn	Val	Ser	Ala	Phe	Leu	Val	Asp	Leu	Ser	Glu	Asp	Lys	Val	130	135	140	
50	Ile	Tyr	Pro	Lys	Ile	Ile	Trp	Ser	Thr	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Lys	145	150	155	160
55	Val	Gly	Val	Asp	Gly	Asp	Thr	Lys	Lys	Pro	Leu	Ala	Gly	Val	Val	Phe	165	170	175	
60	Glu	Leu	Tyr	Glu	Lys	Asn	Gly	Arg	Thr	Pro	Ile	Arg	Val	Lys	Asn	Gly	180	185	190	
65	Val	His	Ser	Gln	Asp	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Leu	Glu	Thr	Asp	Ser	195	200	205	
	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Ile	Ser	Gly	Leu	Ile	His	Gly	Asp	Tyr	Val	Leu	210	215	220	

ES 2 286 133 T3

	Lys Glu Ile Glu Thr Gln Ser Gly Tyr Gln Ile Gly Gln Ala Glu Thr	
	225	230 235 240
5	Ala Val Thr Ile Glu Lys Ser Lys Thr Val Thr Val Thr Ile Glu Asn	
		245 250 255
10	Lys Lys Val Pro Thr Pro Lys Val Pro Ser Arg Gly Gly Leu Ile Pro	
		260 265 270
15	Lys Thr Gly Glu Gln Gln Ala Met Ala Leu Val Ile Ile Gly Gly Ile	
		275 280 285
20	Leu Ile Ala Leu Ala Leu Arg Leu Leu Ser Lys His Arg Lys His Gln	
		290 295 300
25	Asn Lys Asp	
	305	
30	<210> 5	
	<211> 918	
	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus agalactiae</i>	
35	<400> 5	
	atgggacaaa aatcaaaaat atctctagct acgaatatcc gtatatggat ttttcgttta 60	
40	atcttcttag cgggttttcc tggttttgga tttcccatcg ttagtcaggt catgtacttt 120	
	caagcctctc acgccaatat taatgctttt aaagaagctg ttaccaagat tgaccgggtg 180	
45	gagattaatc ggcgtttaga acttgcttat gcttataacg ccagtatagc aggtgccaaa 240	
	actaatggcg aatatccagc gcttaaagac cctactctg ctgaacaaaa gcaggcaggg 300	
50	gtcgttgagt acgcccgcgt gcttgaagtc aaagaacaaa taggtcatgt gattattcca 360	
	agaattaatc aggatatccc tatttacgct ggctctgctg aagaaaatct tcagaggggc 420	
55	gttggacatt tagaggggac cagtcttcca gtcggtggtg agtcaactca tgccgttcta 480	
	actgccatc gagggctacc aacggccaag ctatttacca atttagacaa ggtaacagta 540	
60	ggtgaccgtt ttacattga acacatcggc ggaaagattg cttatcaggt agaccaaate 600	
	aaagttatcg cccctgatca gttagaggat ttgtacgtga ttcaaggaga agatcacgtc 660	
65	accctattaa cttgcacacc ttatatgata aatagtcacg gctcctcgt tcgaggcaag 720	

ES 2 286 133 T3

cgaattcctt atgtggaaaa aacagtgcag aaagattcaa agaccttcag gcaacaacaa 780
 tacctaacct atgctatgtg ggtagtcgtt ggacttatct tgctgtcgct tctcatttgg 840
 5 tttaaaaaga cgaaacagaa aaagcggaga aagaatgaaa aagcggctag tcaaaatagt 900
 cacaataatt cgaaataa 918

<210> 6

<211> 305

<212> PRT

<213> *Streptococcus agalactiae*

<400> 6

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

ES 2 286 133 T3

Lys Val Thr Val Gly Asp Arg Phe Tyr Ile Glu His Ile Gly Gly Lys
180 185 190

5 Ile Ala Tyr Gln Val Asp Gln Ile Lys Val Ile Ala Pro Asp Gln Leu
195 200 205

10 Glu Asp Leu Tyr Val Ile Gln Gly Glu Asp His Val Thr Leu Leu Thr
210 215 220

15 Cys Thr Pro Tyr Met Ile Asn Ser His Arg Leu Leu Val Arg Gly Lys
225 230 235 240

Arg Ile Pro Tyr Val Glu Lys Thr Val Gln Lys Asp Ser Lys Thr Phe
245 250 255

20 Arg Gln Gln Gln Tyr Leu Thr Tyr Ala Met Trp Val Val Val Gly Leu
260 265 270

25 Ile Leu Leu Ser Leu Leu Ile Trp Phe Lys Lys Thr Lys Gln Lys Lys
275 280 285

30 Arg Arg Lys Asn Glu Lys Ala Ala Ser Gln Asn Ser His Asn Asn Ser
290 295 300

Lys
305

35

<210> 7

<211> 852

40 <212> ADN

<213> *Streptococcus agalactiae*

<400> 7

45

atgaaaaagc ggctagtcaa aatagtcaca ataattcgaa ataataaaat cagaaccctc 60

atTTTTgtga tgggaagtct gattctotta tttccgattg tgagccaggt aagttactac 120

50

cttgcttcgc atcaaaatat taatcaattt aagcgggaag tcgctaagat tgataactaat 180

acggttgaac gacgcatcgc tttagctaata gcttacaatg agacgttatc aaggaatccc 240

55

ttgcttatag acccttttac cagtaagcaa aaagaagggt tgagagagta tgctcgtatg 300

cttgaagttc atgagcaaat aggtcatgtg gcaatcccaa gtattgggggt tgatattcca 360

60

atttatgctg gaacatccga aactgtgctt cagaaaggta gtgggcattt ggagggaacc 420

65

ES 2 286 133 T3

```

agtcttccag tgggaggttt gtcaacccat tcagtactaa ctgcccaccg tggttgcca 480
acagctaggc tatttaccga cttaaataaa gttaaaaaag gccagatttt ctatgtgacg 540
aacatcaagg aaacacttgc ctacaaagtc gtgtctatca aagttgtgga tccaacagct 600
ttaagtgagg ttaagattgt caatggtaag gattatataa ccttgctgac ttgcacacct 660
tacatgatca atagtcacg tctcttgga aaaggagagc gtattcctta tgattctacc 720
gaggcggaaa agcacaaaga acaaaccgta caagattatc gtttgtcact agtggtgaag 780
atactactag tattattaat tggactcttc atcgtgataa tgatgagaag atggatgcaa 840
catcgtcaat aa 852

```

<210> 8

<211> 283

25 <212> PRT

<213> *Streptococcus agalactiae*

<400> 8

30

```

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

```

60

65

ES 2 286 133 T3

	Val	Leu	Gln	Lys	Gly	Ser	Gly	His	Leu	Glu	Gly	Thr	Ser	Leu	Pro	Val	
	130						135					140					
5	Gly	Gly	Leu	Ser	Thr	His	Ser	Val	Leu	Thr	Ala	His	Arg	Gly	Leu	Pro	
	145					150					155				160		
10	Thr	Ala	Arg	Leu	Phe	Thr	Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Lys	Lys	Gly	Gln	Ile	
					165					170					175		
15	Phe	Tyr	Val	Thr	Asn	Ile	Lys	Glu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Lys	Val	Val	Ser	
				180					185					190			
20	Ile	Lys	Val	Val	Asp	Pro	Thr	Ala	Leu	Ser	Glu	Val	Lys	Ile	Val	Asn	
			195				200						205				
25	Gly	Lys	Asp	Tyr	Ile	Thr	Leu	Leu	Thr	Cys	Thr	Pro	Tyr	Met	Ile	Asn	
	210						215					220					
30	Ser	His	Arg	Leu	Leu	Val	Lys	Gly	Glu	Arg	Ile	Pro	Tyr	Asp	Ser	Thr	
	225					230					235					240	
35	Glu	Ala	Glu	Lys	His	Lys	Glu	Gln	Thr	Val	Gln	Asp	Tyr	Arg	Leu	Ser	
					245					250					255		
40	Leu	Val	Leu	Lys	Ile	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Ile	Gly	Leu	Phe	Ile	Val	
				260					265					270			
45	Ile	Met	Met	Arg	Arg	Trp	Met	Gln	His	Arg	Gln						
		275						280									
50	<210> 9																
	<211> 2712																
	<212> ADN																
	<213> <i>Streptococcus agalactiae</i>																
55	<400> 9																
60	atgatgattg tgaataatgg ttatctagaa gggagaaaaa tgaaaaagag acaaaaaata 60																
65	tggagagggt tatcagttac ttactaatc ctgtcccaaa ttccatttgg tatattggta 120																
	caaggtgaaa cccaagatac caatcaagca cttggaaaag taattgttaa aaaaacggga 180																
	gacaatgcta caccattagg caaagcgact tttgtgttaa aaaatgacaa tgataagtca 240																
	gaaacaagtc acgaaacggt agagggttct ggagaagcaa cctttgaaaa cataaaacct 300																
	ggagactaca cattaagaga agaaacagca ccaattgggtt ataaaaaac tgataaaacc 360																

ES 2 286 133 T3

5 tggaagttta aagttgcaga taacggagca acaataatcg agggatatgga tgcagataaa 420
 gcagagaaac gaaaagaagt tttgaatgcc caatatccaa aatcagctat ttatgaggat 480
 10 acaaaagaaa attaccatt agttaatgta gagggttcca aagttggtga acaatacaaa 540
 gcattgaatc caataaatgg aaaagatggg cgaagagaga ttgctgaagg ttggttatca 600
 aaaaaaata caggggtcaa tgatctcgat aagaataaat ataaaattga attaaactgtt 660
 15 gagggtaaaa ccactgttga aacgaaagaa cttaatcaac cactagatgt cgttgtgcta 720
 ttagataatt caaatagtat gaataatgaa agagccaata attctcaaag agcattaataa 780
 20 gctggggaag cagttgaaaa gctgattgat aaaattacat caaataaaga caatagagta 840
 gctcttgtga catatgcctc aaccattttt gatgggtactg aagcgaccgt atcaaaggga 900
 gttgccgac aaaaatggtaa agcgctgaat gatagtgtat catggggatta tcataaaact 960
 25 acttttacag caactacaca taattacagt tatttaaatt taacaaatga tgctaacgaa 1020
 gttaatatcc taaagtcaag aattccaaag gaagcggagc atataaatgg ggatcgcacg 1080
 30 ctctatcaat ttggtgcgac atttactcaa aaagctctaa tgaaagcaaa tgaaatttta 1140
 gagacacaaa gttctaattgc tagaaaaaaa cttatttttc acgtaactga tgggtgtccct 1200
 35 acgatgtctt atgccataaa ttttaatcct tatatatcaa catcttacca aaaccagttt 1260
 aattcttttt taaataaaaat accagataga agtgggtattc tccaagagga ttttataatc 1320
 40 aatggtgatg attatcaaat agtaaaagga gatggagaga gttttaaact gttttcggtat 1380
 agaaaagtcc ctgttactgg aggaacgaca caagcagctt atcgagtacc gcaaaatcaa 1440
 45 ctctctgtaa tgagtaatga gggatatgca attaatagtg gatataattt tctctattgg 1500
 agagattaca actgggtcta tccatttgat cctaagacaa agaaagtttc tgcaacgaaa 1560
 50 caaatcaaaa ctcatgggtga gccacaaca ttatacttta atggaaatat aagacctaaa 1620
 gggttatgaca tttttactgt tgggattggg gtaaacggag atcctggtgc aactcctctt 1680
 55 gaagctgaga aatttatgca atcaatatca agtaaaacag aaaattatac taatgttgat 1740
 gatacaaata aaatttatga tgagctaaat aaatacttta aaacaattgt tgaggaaaaa 1800
 60

65

ES 2 286 133 T3

cattctattg ttgatggaaa tgtgactgat cctatgggag agatgattga attccaatta 1860
 aaaaatggtc aaagttttac acatgatgat tacgttttgg ttggaaatga tggcagtc 1920
 5 ttaaaaaatg gtgtggctct tgggtggacca aacagtgatg ggggaatttt aaaagatgtt 1980
 acagtgactt atgataagac atctcaaacc atcaaaatca atcatttgaa cttaggaagt 2040
 10 ggacaaaaag tagttcttac ctatgatgta cgtttaaaag ataactatat aagtaacaaa 2100
 ttttacaata caaataatcg tacaacgcta agtccgaaga gtgaaaaaga accaaatact 2160
 15 attcgtgatt tcccaattcc caaaattcgt gatgttcgtg agtttccggt actaaccatc 2220
 agtaatcaga agaaaatggg tgaggttgaa tttattaaag ttaataaaga caaacattca 2280
 20 gaatcgcttt tgggagctaa gtttcaactt cagatagaaa aagatttttc tgggtataag 2340
 caatttgttc cagaggggaag tgatgttaca acaagaatg atggtaaaat ttattttaaa 2400
 25 gcacttcaag atggtaacta taaattatat gaaatttcaa gtccagatgg ctatatagag 2460
 gttaaaacga aacctgttgt gacatttaca attcaaaatg gagaagttac gaacctgaaa 2520
 30 gcagatccaa atgctaataa aaatcaaate gggatatctg aaggaaatgg taaacatctt 2580
 attaccaaca ctcccaaacg cccaccaggt gtttttccta aaacaggggg aattggtaca 2640
 35 attgtctata tattagttgg ttctactttt atgatactta ccatttgttc tttccgtcgt 2700
 aaacaattgt aa 2712

<210> 10

<211> 903

<212> PRT

<213> *Streptococcus agalactiae*

<400> 10

Met Met Ile Val Asn Asn Gly Tyr Leu Glu Gly Arg Lys Met Lys Lys
 1 5 10 15
 Arg Gln Lys Ile Trp Arg Gly Leu Ser Val Thr Leu Leu Ile Leu Ser
 20 25 30
 Gln Ile Pro Phe Gly Ile Leu Val Gln Gly Glu Thr Gln Asp Thr Asn
 35 40 45

ES 2 286 133 T3

	Gln	Ala	Leu	Gly	Lys	Val	Ile	Val	Lys	Lys	Thr	Gly	Asp	Asn	Ala	Thr	
	50						55					60					
5	Pro	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Phe	Val	Leu	Lys	Asn	Asp	Asn	Asp	Lys	Ser	
	65					70				75					80		
10	Glu	Thr	Ser	His	Glu	Thr	Val	Glu	Gly	Ser	Gly	Glu	Ala	Thr	Phe	Glu	
				85					90				95				
15	Asn	Ile	Lys	Pro	Gly	Asp	Tyr	Thr	Leu	Arg	Glu	Glu	Thr	Ala	Pro	Ile	
				100					105				110				
20	Gly	Tyr	Lys	Lys	Thr	Asp	Lys	Thr	Trp	Lys	Val	Lys	Val	Ala	Asp	Asn	
			115					120				125					
25	Gly	Ala	Thr	Ile	Ile	Glu	Gly	Met	Asp	Ala	Asp	Lys	Ala	Glu	Lys	Arg	
		130					135				140						
30	Lys	Glu	Val	Leu	Asn	Ala	Gln	Tyr	Pro	Lys	Ser	Ala	Ile	Tyr	Glu	Asp	
	145					150				155					160		
35	Thr	Lys	Glu	Asn	Tyr	Pro	Leu	Val	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Lys	Val	Gly	
				165					170						175		
40	Glu	Gln	Tyr	Lys	Ala	Leu	Asn	Pro	Ile	Asn	Gly	Lys	Asp	Gly	Arg	Arg	
				180					185					190			
45	Glu	Ile	Ala	Glu	Gly	Trp	Leu	Ser	Lys	Lys	Asn	Thr	Gly	Val	Asn	Asp	
		195						200					205				
50	Leu	Asp	Lys	Asn	Lys	Tyr	Lys	Ile	Glu	Leu	Thr	Val	Glu	Gly	Lys	Thr	
	210						215					220					
55	Thr	Val	Glu	Thr	Lys	Glu	Leu	Asn	Gln	Pro	Leu	Asp	Val	Val	Val	Leu	
	225					230				235						240	
60	Leu	Asp	Asn	Ser	Asn	Ser	Met	Asn	Asn	Glu	Arg	Ala	Asn	Asn	Ser	Gln	
				245					250				255				
65	Arg	Ala	Leu	Lys	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Glu	Lys	Leu	Ile	Asp	Lys	Ile	
			260						265				270				
70	Thr	Ser	Asn	Lys	Asp	Asn	Arg	Val	Ala	Leu	Val	Thr	Tyr	Ala	Ser	Thr	
		275					280					285					
75	Ile	Phe	Asp	Gly	Thr	Glu	Ala	Thr	Val	Ser	Lys	Gly	Val	Ala	Asp	Gln	
	290					295						300					

ES 2 286 133 T3

	Asn Gly Lys Ala Leu Asn Asp Ser Val Ser Trp Asp Tyr His Lys Thr	
	305	310 315 320
5	Thr Phe Thr Ala Thr Thr His Asn Tyr Ser Tyr Leu Asn Leu Thr Asn	
		325 330 335
10	Asp Ala Asn Glu Val Asn Ile Leu Lys Ser Arg Ile Pro Lys Glu Ala	
		340 345 350
15	Glu His Ile Asn Gly Asp Arg Thr Leu Tyr Gln Phe Gly Ala Thr Phe	
		355 360 365
20	Thr Gln Lys Ala Leu Met Lys Ala Asn Glu Ile Leu Glu Thr Gln Ser	
		370 375 380
25	Ser Asn Ala Arg Lys Lys Leu Ile Phe His Val Thr Asp Gly Val Pro	
		385 390 395 400
30	Thr Met Ser Tyr Ala Ile Asn Phe Asn Pro Tyr Ile Ser Thr Ser Tyr	
		405 410 415
35	Gln Asn Gln Phe Asn Ser Phe Leu Asn Lys Ile Pro Asp Arg Ser Gly	
		420 425 430
40	Ile Leu Gln Glu Asp Phe Ile Ile Asn Gly Asp Asp Tyr Gln Ile Val	
		435 440 445
45	Lys Gly Asp Gly Glu Ser Phe Lys Leu Phe Ser Asp Arg Lys Val Pro	
		450 455 460
50	Val Thr Gly Gly Thr Thr Gln Ala Ala Tyr Arg Val Pro Gln Asn Gln	
		465 470 475 480
55	Leu Ser Val Met Ser Asn Glu Gly Tyr Ala Ile Asn Ser Gly Tyr Ile	
		485 490 495
60	Tyr Leu Tyr Trp Arg Asp Tyr Asn Trp Val Tyr Pro Phe Asp Pro Lys	
		500 505 510
65	Thr Lys Lys Val Ser Ala Thr Lys Gln Ile Lys Thr His Gly Glu Pro	
		515 520 525
70	Thr Thr Leu Tyr Phe Asn Gly Asn Ile Arg Pro Lys Gly Tyr Asp Ile	
		530 535 540
75	Phe Thr Val Gly Ile Gly Val Asn Gly Asp Pro Gly Ala Thr Pro Leu	
		545 550 555 560

ES 2 286 133 T3

	Glu	Ala	Glu	Lys	Phe	Met	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Thr	Glu	Asn	Tyr	
					565					570					575		
5	Thr	Asn	Val	Asp	Asp	Thr	Asn	Lys	Ile	Tyr	Asp	Glu	Leu	Asn	Lys	Tyr	
					580				585					590			
10	Phe	Lys	Thr	Ile	Val	Glu	Glu	Lys	His	Ser	Ile	Val	Asp	Gly	Asn	Val	
					595			600					605				
15	Thr	Asp	Pro	Met	Gly	Glu	Met	Ile	Glu	Phe	Gln	Leu	Lys	Asn	Gly	Gln	
					610			615				620					
20	Ser	Phe	Thr	His	Asp	Asp	Tyr	Val	Leu	Val	Gly	Asn	Asp	Gly	Ser	Gln	
					625			630			635					640	
25	Leu	Lys	Asn	Gly	Val	Ala	Leu	Gly	Gly	Pro	Asn	Ser	Asp	Gly	Gly	Ile	
					645					650					655		
30	Leu	Lys	Asp	Val	Thr	Val	Thr	Tyr	Asp	Lys	Thr	Ser	Gln	Thr	Ile	Lys	
					660				665					670			
35	Ile	Asn	His	Leu	Asn	Leu	Gly	Ser	Gly	Gln	Lys	Val	Val	Leu	Thr	Tyr	
					675			680					685				
40	Asp	Val	Arg	Leu	Lys	Asp	Asn	Tyr	Ile	Ser	Asn	Lys	Phe	Tyr	Asn	Thr	
					690			695				700					
45	Asn	Asn	Arg	Thr	Thr	Leu	Ser	Pro	Lys	Ser	Glu	Lys	Glu	Pro	Asn	Thr	
						705					710		715			720	
50	Ile	Arg	Asp	Phe	Pro	Ile	Pro	Lys	Ile	Arg	Asp	Val	Arg	Glu	Phe	Pro	
					725					730				735			
55	Val	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Gln	Lys	Lys	Met	Gly	Glu	Val	Glu	Phe	Ile	
					740				745					750			
60	Lys	Val	Asn	Lys	Asp	Lys	His	Ser	Glu	Ser	Leu	Leu	Gly	Ala	Lys	Phe	
					755			760					765				
65	Gln	Leu	Gln	Ile	Glu	Lys	Asp	Phe	Ser	Gly	Tyr	Lys	Gln	Phe	Val	Pro	
					770			775				780					
70	Glu	Gly	Ser	Asp	Val	Thr	Thr	Lys	Asn	Asp	Gly	Lys	Ile	Tyr	Phe	Lys	
					785			790			795					800	
75	Ala	Leu	Gln	Asp	Gly	Asn	Tyr	Lys	Leu	Tyr	Glu	Ile	Ser	Ser	Pro	Asp	
					805					810					815		

ES 2 286 133 T3

Gly Tyr Ile Glu Val Lys Thr Lys Pro Val Val Thr Phe Thr Ile Gln
 820 825 830
 5 Asn Gly Glu Val Thr Asn Leu Lys Ala Asp Pro Asn Ala Asn Lys Asn
 835 840 845
 10 Gln Ile Gly Tyr Leu Glu Gly Asn Gly Lys His Leu Ile Thr Asn Thr
 850 855 860
 15 Pro Lys Arg Pro Pro Gly Val Phe Pro Lys Thr Gly Gly Ile Gly Thr
 865 870 875 880
 20 Ile Val Tyr Ile Leu Val Gly Ser Thr Phe Met Ile Leu Thr Ile Cys
 885 890 895
 Ser Phe Arg Arg Lys Gln Leu
 900

<210> 11

25 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 11

35

ctaggtggat ccttcggcaa t

21

<210> 12

40 <211> 10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 12

50

cgattgccga

10

<210> 13

55 <211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 13

65

aggcaactgt gctaaccgag ggaat

25

ES 2 286 133 T3

<210> 14
 <211> 11
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido
 10
 <400> 14

 cgattccctc g 11
 15
 <210> 15
 <211> 1509
 <212> ADN
 20 <213> *Streptococcus agalactiae*

 <220>
 <221> CDS
 25 <222> (1)..(1509)

 <400> 15
 30
 atg aaa aag aaa atg att caa tcg ctg tta gtg gcg agt tta gca ttt 48
 Met Lys Lys Lys Met Ile Gln Ser Leu Leu Val Ala Ser Leu Ala Phe
 1 5 10 15
 35
 ggt atg gct gta tca cca gtt acg ccg ata gct ttt gcc gct gag aca 96
 Gly Met Ala Val Ser Pro Val Thr Pro Ile Ala Phe Ala Ala Glu Thr
 20 25 30
 40
 ggg aca att aca gtt caa gat act caa aaa ggc gca acc tat aaa gca 144
 Gly Thr Ile Thr Val Gln Asp Thr Gln Lys Gly Ala Thr Tyr Lys Ala
 35 40 45
 45
 tat aaa gtt ttt gat gca gaa ata gat aat gca aat gta tct gat tcg 192
 Tyr Lys Val Phe Asp Ala Glu Ile Asp Asn Ala Asn Val Ser Asp Ser
 50 50 55 60
 aat aaa gat gga gct tct tat tta att cct caa ggt aaa gaa gct gag 240
 Asn Lys Asp Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Pro Gln Gly Lys Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 55
 60
 65

ES 2 286 133 T3

	tat aaa gct tca act gat ttt aat tct ctt ttt acg aca act act aat	288
	Tyr Lys Ala Ser Thr Asp Phe Asn Ser Leu Phe Thr Thr Thr Thr Asn	
5	85 90 95	
	gga ggg aga aca tat gta act aaa aaa gat act gcg tca gca aat gag	336
	Gly Gly Arg Thr Tyr Val Thr Lys Lys Asp Thr Ala Ser Ala Asn Glu	
10	100 105 110	
	att gcg aca tgg gct aaa tct ata tca gct aat act aca cca gtt tcc	384
	Ile Ala Thr Trp Ala Lys Ser Ile Ser Ala Asn Thr Thr Pro Val Ser	
15	115 120 125	
	act gtt act gag tca aat aat gat ggt act gag gtt att aat gtt tcc	432
	Thr Val Thr Glu Ser Asn Asn Asp Gly Thr Glu Val Ile Asn Val Ser	
20	130 135 140	
	caa tat gga tat tat tat gtt tct agc act gtt aat aat gga gct gta	480
	Gln Tyr Gly Tyr Tyr Tyr Val Ser Ser Thr Val Asn Asn Gly Ala Val	
25	145 150 155 160	
	att atg gtt aca tct gta act cca aat gct act att cat gaa aag aat	528
	Ile Met Val Thr Ser Val Thr Pro Asn Ala Thr Ile His Glu Lys Asn	
30	165 170 175	
	act gat gcg aca tgg gga gat ggt ggt gga aaa act gta gat caa aaa	576
	Thr Asp Ala Thr Trp Gly Asp Gly Gly Gly Lys Thr Val Asp Gln Lys	
35	180 185 190	
	acg tac tcg gtt ggt gat aca gtc aaa tat act att act tat aag aat	624
	Thr Tyr Ser Val Gly Asp Thr Val Lys Tyr Thr Ile Thr Tyr Lys Asn	
40	195 200 205	
	gca gtc aat tat cat ggt aca gaa aaa gtg tat caa tat gtt ata aag	672
	Ala Val Asn Tyr His Gly Thr Glu Lys Val Tyr Gln Tyr Val Ile Lys	
45	210 215 220	
	gat act atg cca tct gct tct gta gtt gat ttg aac gaa ggg tct tat	720
	Asp Thr Met Pro Ser Ala Ser Val Val Asp Leu Asn Glu Gly Ser Tyr	
50	225 230 235 240	
	gaa gta act att act gat gga tca ggg aat att aca act cta act caa	768
	Glu Val Thr Ile Thr Asp Gly Ser Gly Asn Ile Thr Thr Leu Thr Gln	
55		
60		
65		

ES 2 286 133 T3

	245	250	255	
5	ggt tgc gaa aaa gca act ggg aag tat aac ctg tta gag gaa aat aat Gly Ser Glu Lys Ala Thr Gly Lys Tyr Asn Leu Leu Glu Glu Asn Asn 260 265 270	816		
10	aat ttc acg att act att ccg tgg gca gct acc aat act cca acc gga Asn Phe Thr Ile Thr Ile Pro Trp Ala Ala Thr Asn Thr Pro Thr Gly 275 280 285	864		
15	aat act caa aat gga gct aat gat gac ttt ttt tat aag gga ata aat Asn Thr Gln Asn Gly Ala Asn Asp Asp Phe Phe Tyr Lys Gly Ile Asn 290 295 300	912		
20	aca atc aca gtc act tat aca gga gta tta aag agt gga gct aaa cca Thr Ile Thr Val Thr Tyr Thr Gly Val Leu Lys Ser Gly Ala Lys Pro 305 310 315 320	960		
25	ggt tca gct gat tta cca gaa aat aca aac att gcg acc atc aac ccc Gly Ser Ala Asp Leu Pro Glu Asn Thr Asn Ile Ala Thr Ile Asn Pro 325 330 335	1008		
30	aat act agc aat gat gac cca ggt caa aaa gta aca gtg agg gat ggt Asn Thr Ser Asn Asp Asp Pro Gly Gln Lys Val Thr Val Arg Asp Gly 340 345 350	1056		
35	caa att act ata aaa aaa att gat ggt tcc aca aaa gct tca tta caa Gln Ile Thr Ile Lys Lys Ile Asp Gly Ser Thr Lys Ala Ser Leu Gln 355 360 365	1104		
40	ggt gct ata ttt gtt tta aag aat gct acg ggt caa ttt cta aac ttt Gly Ala Ile Phe Val Leu Lys Asn Ala Thr Gly Gln Phe Leu Asn Phe 370 375 380	1152		
45	aac gat aca aat aac gtt gaa tgg ggc aca gaa gct aat gca aca gaa Asn Asp Thr Asn Asn Val Glu Trp Gly Thr Glu Ala Asn Ala Thr Glu 385 390 395 400	1200		
50	tat aca aca gga gca gat ggt ata att acc att aca ggc ttg aaa gaa Tyr Thr Thr Gly Ala Asp Gly Ile Ile Thr Ile Thr Gly Leu Lys Glu 405 410 415	1248		
55	ggt aca tac tat cta gtt gag aaa aag gct ccc tta ggt tac aat ttg Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Glu Lys Lys Ala Pro Leu Gly Tyr Asn Leu 420 425 430	1296		
60	tta gat aac tct cag aag gtt att tta gga gat gga gcc act gat acg Leu Asp Asn Ser Gln Lys Val Ile Leu Gly Asp Gly Ala Thr Asp Thr	1344		

65

ES 2 286 133 T3

	435	440	445	
5	act aat tca gat aac ctt tta gtt aac cca act gtt gaa aat aac aaa			1392
	Thr Asn Ser Asp Asn Leu Leu Val Asn Pro Thr Val Glu Asn Asn Lys			
	450	455	460	
10	ggt act gag ttg cct tca aca ggt ggt att ggt aca aca att ttc tac			1440
	Gly Thr Glu Leu Pro Ser Thr Gly Gly Ile Gly Thr Thr Ile Phe Tyr			
	465	470	475	480
15	att ata ggt gca att tta gta ata gga gca ggt atc gtg ctt gtt gct			1488
	Ile Ile Gly Ala Ile Leu Val Ile Gly Ala Gly Ile Val Leu Val Ala			
		485	490	495
20	cgt cgt cgt tta cgt tct taa			1509
	Arg Arg Arg Leu Arg Ser			
	500			
25	<210> 16			
	<211> 502			
	<212> PRT			
	<213> <i>Streptococcus agalactiae</i>			
30	<400> 16			
35	Met Lys Lys Lys Met Ile Gln Ser Leu Leu Val Ala Ser Leu Ala Phe			
	1	5	10	15
40	Gly Met Ala Val Ser Pro Val Thr Pro Ile Ala Phe Ala Ala Glu Thr			
		20	25	30
45	Gly Thr Ile Thr Val Gln Asp Thr Gln Lys Gly Ala Thr Tyr Lys Ala			
		35	40	45
50	Tyr Lys Val Phe Asp Ala Glu Ile Asp Asn Ala Asn Val Ser Asp Ser			
		50	55	60
55	Asn Lys Asp Gly Ala Ser Tyr Leu Ile Pro Gln Gly Lys Glu Ala Glu			
		65	70	75
60	Tyr Lys Ala Ser Thr Asp Phe Asn Ser Leu Phe Thr Thr Thr Thr Asn			
		85	90	95
65	Gly Gly Arg Thr Tyr Val Thr Lys Lys Asp Thr Ala Ser Ala Asn Glu			
		100	105	110
70	Ile Ala Thr Trp Ala Lys Ser Ile Ser Ala Asn Thr Thr Pro Val Ser			
		115	120	125

ES 2 286 133 T3

	Thr	Val	Thr	Glu	Ser	Asn	Asn	Asp	Gly	Thr	Glu	Val	Ile	Asn	Val	Ser	
	130						135					140					
5	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Val	Ser	Ser	Thr	Val	Asn	Asn	Gly	Ala	Val	
	145					150					155					160	
10	Ile	Met	Val	Thr	Ser	Val	Thr	Pro	Asn	Ala	Thr	Ile	His	Glu	Lys	Asn	
					165					170					175		
15	Thr	Asp	Ala	Thr	Trp	Gly	Asp	Gly	Gly	Gly	Lys	Thr	Val	Asp	Gln	Lys	
				180					185						190		
20	Thr	Tyr	Ser	Val	Gly	Asp	Thr	Val	Lys	Tyr	Thr	Ile	Thr	Tyr	Lys	Asn	
			195					200						205			
25	Ala	Val	Asn	Tyr	His	Gly	Thr	Glu	Lys	Val	Tyr	Gln	Tyr	Val	Ile	Lys	
	210						215					220					
30	Asp	Thr	Met	Pro	Ser	Ala	Ser	Val	Val	Asp	Leu	Asn	Glu	Gly	Ser	Tyr	
	225					230					235					240	
35	Glu	Val	Thr	Ile	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Asn	Ile	Thr	Thr	Leu	Thr	Gln	
					245					250					255		
40	Gly	Ser	Glu	Lys	Ala	Thr	Gly	Lys	Tyr	Asn	Leu	Leu	Glu	Glu	Asn	Asn	
				260					265					270			
45	Asn	Phe	Thr	Ile	Thr	Ile	Pro	Trp	Ala	Ala	Thr	Asn	Thr	Pro	Thr	Gly	
			275					280					285				
50	Asn	Thr	Gln	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Asp	Phe	Phe	Tyr	Lys	Gly	Ile	Asn	
	290						295					300					
55	Thr	Ile	Thr	Val	Thr	Tyr	Thr	Gly	Val	Leu	Lys	Ser	Gly	Ala	Lys	Pro	
	305					310					315					320	
60	Gly	Ser	Ala	Asp	Leu	Pro	Glu	Asn	Thr	Asn	Ile	Ala	Thr	Ile	Asn	Pro	
					325					330					335		
65	Asn	Thr	Ser	Asn	Asp	Asp	Pro	Gly	Gln	Lys	Val	Thr	Val	Arg	Asp	Gly	
				340					345					350			
70	Gln	Ile	Thr	Ile	Lys	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Thr	Lys	Ala	Ser	Leu	Gln	
			355					360					365				
75	Gly	Ala	Ile	Phe	Val	Leu	Lys	Asn	Ala	Thr	Gly	Gln	Phe	Leu	Asn	Phe	
	370						375					380					

ES 2 286 133 T3

	Asn	Asp	Thr	Asn	Asn	Val	Glu	Trp	Gly	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Thr	Glu
	385					390					395					400
5	Tyr	Thr	Thr	Gly	Ala	Asp	Gly	Ile	Ile	Thr	Ile	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu
				405						410					415	
10	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Val	Glu	Lys	Lys	Ala	Pro	Leu	Gly	Tyr	Asn	Leu
				420					425					430		
15	Leu	Asp	Asn	Ser	Gln	Lys	Val	Ile	Leu	Gly	Asp	Gly	Ala	Thr	Asp	Thr
			435					440					445			
20	Thr	Asn	Ser	Asp	Asn	Leu	Leu	Val	Asn	Pro	Thr	Val	Glu	Asn	Asn	Lys
	450						455					460				
25	Gly	Thr	Glu	Leu	Pro	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	Gly	Thr	Thr	Ile	Phe	Tyr
	465					470					475					480
30	Ile	Ile	Gly	Ala	Ile	Leu	Val	Ile	Gly	Ala	Gly	Ile	Val	Leu	Val	Ala
				485					490						495	
35	Arg	Arg	Arg	Leu	Arg	Ser										
				500												

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: consenso

<220>

<223> X puede ser un aminoácido

<400> 17

Leu	Pro	Xaa	Thr	Gly
1				5

<210> 18

<211> 1683

<212> ADN

<213> *Streptococcus agalactiae*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1683)

ES 2 286 133 T3

<400> 18

5	atg gtg atc gta ttc cgg att ata cag ata tta caa ggg att ata tcc	48
	Met Val Ile Val Phe Arg Ile Ile Gln Ile Leu Gln Gly Ile Ile Ser	
	1 5 10 15	
10	aag atc ctt cag gta cat att att ata agt atg att cac gag ata aag	96
	Lys Ile Leu Gln Val His Ile Ile Ile Ser Met Ile His Glu Ile Lys	
	20 25 30	
15	atc ccg act caa cta aag atg cct att ata cga cag ata cta gtc tca	144
	Ile Pro Thr Gln Leu Lys Met Pro Ile Ile Arg Gln Ile Leu Val Ser	
	35 40 45	
20	tca aat gtt gat aca aca act aag tac aag tac gta aaa gac gct tac	192
	Ser Asn Val Asp Thr Thr Thr Lys Tyr Lys Tyr Val Lys Asp Ala Tyr	
	50 55 60	
25	aaa tta gtc ggt tgg tat tat gtt aat cca tat ggt agt att aga cct	240
	Lys Leu Val Gly Trp Tyr Tyr Val Asn Pro Tyr Gly Ser Ile Arg Pro	
	65 70 75 80	
30	tat aac ttt tca ggt gct gta act caa gat atc aat tta aga gct att	288
	Tyr Asn Phe Ser Gly Ala Val Thr Gln Asp Ile Asn Leu Arg Ala Ile	
	85 90 95	
35	tgg cga aag gct gga gat tat cat att ata tac agc aat gat gct gtt	336
	Trp Arg Lys Ala Gly Asp Tyr His Ile Ile Tyr Ser Asn Asp Ala Val	
	100 105 110	
40	ggt aca gat gga aag cca gca ttg gat gct tct ggt cag caa tta caa	384
	Gly Thr Asp Gly Lys Pro Ala Leu Asp Ala Ser Gly Gln Gln Leu Gln	
	115 120 125	
45	aca agt aat gag cct act gac cct gat tcc tat gac gat ggc tcc cat	432
	Thr Ser Asn Glu Pro Thr Asp Pro Asp Ser Tyr Asp Asp Gly Ser His	
	130 135 140	
50	tca gcc tta ctg aga cgt ccg aca atg cca gat ggc tat cgt ttc cgt	480
	Ser Ala Leu Leu Arg Arg Pro Thr Met Pro Asp Gly Tyr Arg Phe Arg	
	145 150 155 160	
55	ggc tgg tgg tac aat ggt aaa att tat aac cca tat gat tcc att gat	528
	Gly Trp Trp Tyr Asn Gly Lys Ile Tyr Asn Pro Tyr Asp Ser Ile Asp	
	165 170 175	

ES 2 286 133 T3

5	att gac gcc cat tta gca gat gct aat aaa aat atc acc ata aaa cct 576 Ile Asp Ala His Leu Ala Asp Ala Asn Lys Asn Ile Thr Ile Lys Pro 180 185 190
10	gtc att att cca gta gga gat atc aaa tta gaa gat acc tcc atc aaa 624 Val Ile Ile Pro Val Gly Asp Ile Lys Leu Glu Asp Thr Ser Ile Lys 195 200 205
15	tac aat ggt aac ggt ggt act aga gta gaa aat ggt aat gtg gta aca 672 Tyr Asn Gly Asn Gly Gly Thr Arg Val Glu Asn Gly Asn Val Val Thr 210 215 220
20	caa gtg gag aca ccg cgt atg gag ttg aat agc aca act aca att cct 720 Gln Val Glu Thr Pro Arg Met Glu Leu Asn Ser Thr Thr Thr Ile Pro 225 230 235 240
25	gaa aac caa tac ttt aca agg aca ggt tac aac ctt att ggt tgg cat 768 Glu Asn Gln Tyr Phe Thr Arg Thr Gly Tyr Asn Leu Ile Gly Trp His 245 250 255
30	cat gat aag gat tta gct gat aca gga cgt gtg gaa ttt aca gca ggt 816 His Asp Lys Asp Leu Ala Asp Thr Gly Arg Val Glu Phe Thr Ala Gly 260 265 270
35	caa tca ata ggt att gat aac aac ctt gat gca aca aat acc tta tat 864 Gln Ser Ile Gly Ile Asp Asn Asn Leu Asp Ala Thr Asn Thr Leu Tyr 275 280 285
40	gct gtt tgg caa cct aaa gaa tac acc gtc gga gta agt aaa act gtc 912 Ala Val Trp Gln Pro Lys Glu Tyr Thr Val Gly Val Ser Lys Thr Val 290 295 300
45	gtt gga cta gat gaa gat aag acg aaa gac ttc ttg ttt aat cca agt 960 Val Gly Leu Asp Glu Asp Lys Thr Lys Asp Phe Leu Phe Asn Pro Ser 305 310 315 320
50	gaa acg ttg caa caa gag aat ttt ccg ctg aga gat ggt cag act aag 1008 Glu Thr Leu Gln Gln Glu Asn Phe Pro Leu Arg Asp Gly Gln Thr Lys 325 330 335
55	gaa ttt aaa gta cct tat gga act tct ata tca ata gat gaa caa gcc 1056 Glu Phe Lys Val Pro Tyr Gly Thr Ser Ile Ser Ile Asp Glu Gln Ala 340 345 350
60	tac gat gaa ttt aaa gta tct gag tca att aca gaa aaa aat cta gca 1104 Tyr Asp Glu Phe Lys Val Ser Glu Ser Ile Thr Glu Lys Asn Leu Ala 355 360 365

65

ES 2 286 133 T3

5	act ggt gaa gct gat aaa act tat gat gct acc ggc tta caa tcc ctg	1152
	Thr Gly Glu Ala Asp Lys Thr Tyr Asp Ala Thr Gly Leu Gln Ser Leu	
	370 375 380	
10	aca gtt tca gga gac gta gat att agc ttt acc aat aca cgt atc aag	1200
	Thr Val Ser Gly Asp Val Asp Ile Ser Phe Thr Asn Thr Arg Ile Lys	
	385 390 395 400	
15	caa aaa gta cga cta cag aaa gtt aat gtc gaa aat gat aat aat ttt	1248
	Gln Lys Val Arg Leu Gln Lys Val Asn Val Glu Asn Asp Asn Asn Phe	
	405 410 415	
20	tta gca ggt gca gtt ttt gat att tat gaa tca gat gct aat ggg aat	1296
	Leu Ala Gly Ala Val Phe Asp Ile Tyr Glu Ser Asp Ala Asn Gly Asn	
	420 425 430	
25	aaa gct tca cat cct atg tat tca ggg ctg gtg aca aac gat aaa ggc	1344
	Lys Ala Ser His Pro Met Tyr Ser Gly Leu Val Thr Asn Asp Lys Gly	
	435 440 445	
30	ttg tta tta gtg gat gct aat aac tac ctc agt ttg oca gta gga aaa	1392
	Leu Leu Leu Val Asp Ala Asn Asn Tyr Leu Ser Leu Pro Val Gly Lys	
	450 455 460	
35	tac tac cta aca gag aca aag gcc cct cca ggg tac cta cta cct aaa	1440
	Tyr Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ala Pro Pro Gly Tyr Leu Leu Pro Lys	
	465 470 475 480	
40	aat gat gat ata tca gta tta gtg att tct acg gga gtt acc ttt gaa	1488
	Asn Asp Asp Ile Ser Val Leu Val Ile Ser Thr Gly Val Thr Phe Glu	
	485 490 495	
45	caa aat ggt aat aat gcg aca cca ata aaa gag aat tta gtg gat gga	1536
	Gln Asn Gly Asn Asn Ala Thr Pro Ile Lys Glu Asn Leu Val Asp Gly	
	500 505 510	
50	agt aca gta tat act ttt aaa att act aac agt aaa gga aca gaa ttg	1584
	Ser Thr Val Tyr Thr Phe Lys Ile Thr Asn Ser Lys Gly Thr Glu Leu	
	515 520 525	
55	cct agt act gga ggt att gga aca cac att tat atc cta gtt ggt tta	1632
	Pro Ser Thr Gly Gly Ile Gly Thr His Ile Tyr Ile Leu Val Gly Leu	
	530 535 540	
60	gct tta gct cta cca tca gga tta ata tta tac tat cga aaa aaa ata	1680
	Ala Leu Ala Leu Pro Ser Gly Leu Ile Leu Tyr Tyr Arg Lys Lys Ile	
	545 550 555 560	
65	tga	1683

ES 2 286 133 T3

<210> 19

<211> 560

<212> PRT

5 <213> *Streptococcus agalactiae*

<400> 19

```

10      Met Val Ile Val Phe Arg Ile Ile Gln Ile Leu Gln Gly Ile Ile Ser
        1             5             10             15

15      Lys Ile Leu Gln Val His Ile Ile Ile Ser Met Ile His Glu Ile Lys
        20             25             30

20      Ile Pro Thr Gln Leu Lys Met Pro Ile Ile Arg Gln Ile Leu Val Ser
        35             40             45

25      Ser Asn Val Asp Thr Thr Thr Lys Tyr Lys Tyr Val Lys Asp Ala Tyr
        50             55             60

30      Lys Leu Val Gly Trp Tyr Tyr Val Asn Pro Tyr Gly Ser Ile Arg Pro
        65             70             75             80

35      Tyr Asn Phe Ser Gly Ala Val Thr Gln Asp Ile Asn Leu Arg Ala Ile
        85             90             95

40      Trp Arg Lys Ala Gly Asp Tyr His Ile Ile Tyr Ser Asn Asp Ala Val
        100            105            110

45      Gly Thr Asp Gly Lys Pro Ala Leu Asp Ala Ser Gly Gln Gln Leu Gln
        115            120            125

50      Thr Ser Asn Glu Pro Thr Asp Pro Asp Ser Tyr Asp Asp Gly Ser His
        130            135            140

55      Ser Ala Leu Leu Arg Arg Pro Thr Met Pro Asp Gly Tyr Arg Phe Arg
        145            150            155            160

60      Gly Trp Trp Tyr Asn Gly Lys Ile Tyr Asn Pro Tyr Asp Ser Ile Asp
        165            170            175

65      Ile Asp Ala His Leu Ala Asp Ala Asn Lys Asn Ile Thr Ile Lys Pro
        180            185            190

70      Val Ile Ile Pro Val Gly Asp Ile Lys Leu Glu Asp Thr Ser Ile Lys
        195            200            205

```

ES 2 286 133 T3

	Tyr	Asn	Gly	Asn	Gly	Gly	Thr	Arg	Val	Glu	Asn	Gly	Asn	Val	Val	Thr	
	210						215						220				
5	Gln	Val	Glu	Thr	Pro	Arg	Met	Glu	Leu	Asn	Ser	Thr	Thr	Thr	Ile	Pro	
	225					230					235					240	
10	Glu	Asn	Gln	Tyr	Phe	Thr	Arg	Thr	Gly	Tyr	Asn	Leu	Ile	Gly	Trp	His	
					245					250					255		
	His	Asp	Lys	Asp	Leu	Ala	Asp	Thr	Gly	Arg	Val	Glu	Phe	Thr	Ala	Gly	
				260					265					270			
15	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Asp	Asn	Asn	Leu	Asp	Ala	Thr	Asn	Thr	Leu	Tyr	
				275			280						285				
20	Ala	Val	Trp	Gln	Pro	Lys	Glu	Tyr	Thr	Val	Gly	Val	Ser	Lys	Thr	Val	
	290					295					300						
25	Val	Gly	Leu	Asp	Glu	Asp	Lys	Thr	Lys	Asp	Phe	Leu	Phe	Asn	Pro	Ser	
	305				310					315					320		
	Glu	Thr	Leu	Gln	Gln	Glu	Asn	Phe	Pro	Leu	Arg	Asp	Gly	Gln	Thr	Lys	
				325			330							335			
30	Glu	Phe	Lys	Val	Pro	Tyr	Gly	Thr	Ser	Ile	Ser	Ile	Asp	Glu	Gln	Ala	
				340			345						350				
35	Tyr	Asp	Glu	Phe	Lys	Val	Ser	Glu	Ser	Ile	Thr	Glu	Lys	Asn	Leu	Ala	
				355			360					365					
40	Thr	Gly	Glu	Ala	Asp	Lys	Thr	Tyr	Asp	Ala	Thr	Gly	Leu	Gln	Ser	Leu	
	370				375					380							
	Thr	Val	Ser	Gly	Asp	Val	Asp	Ile	Ser	Phe	Thr	Asn	Thr	Arg	Ile	Lys	
	385				390					395					400		
45	Gln	Lys	Val	Arg	Leu	Gln	Lys	Val	Asn	Val	Glu	Asn	Asp	Asn	Asn	Phe	
				405			410							415			
50	Leu	Ala	Gly	Ala	Val	Phe	Asp	Ile	Tyr	Glu	Ser	Asp	Ala	Asn	Gly	Asn	
				420			425						430				
	Lys	Ala	Ser	His	Pro	Met	Tyr	Ser	Gly	Leu	Val	Thr	Asn	Asp	Lys	Gly	
55				435			440					445					
	Leu	Leu	Leu	Val	Asp	Ala	Asn	Asn	Tyr	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Gly	Lys	
	450				455					460							

ES 2 286 133 T3

Tyr Tyr Leu Thr Glu Thr Lys Ala Pro Pro Gly Tyr Leu Leu Pro Lys
 465 470 475 480

5 Asn Asp Asp Ile Ser Val Leu Val Ile Ser Thr Gly Val Thr Phe Glu
 485 490 495

10 Gln Asn Gly Asn Asn Ala Thr Pro Ile Lys Glu Asn Leu Val Asp Gly
 500 505 510

15 Ser Thr Val Tyr Thr Phe Lys Ile Thr Asn Ser Lys Gly Thr Glu Leu
 515 520 525

20 Pro Ser Thr Gly Gly Ile Gly Thr His Ile Tyr Ile Leu Val Gly Leu
 530 535 540

25 Ala Leu Ala Leu Pro Ser Gly Leu Ile Leu Tyr Tyr Arg Lys Lys Ile
 545 550 555 560

25 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: consenso

35 <400> 20
 Leu Pro Ser Thr Gly Gly
 1 5

40 <210> 21
 <211> 6
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: consenso

50 <220>
 <223> X puede ser un aminoácido.

55 <400> 21
 Xaa Pro Xaa Thr Gly Gly
 1 5

60 <210> 22
 <211> 2714
 <212> ADN
 65 <213> *Streptococcus pneumoniae*

ES 2 286 133 T3

<400> 22

5 caatcagaaa ttaccacgtg gcaatgttga ctttatgaag gtggatggtc ggaccaatac 60
ctctcttcaa ggggcaatgt tcaaagtcac gaaagaagaa agcggacact atactcctgt 120
10 tcttcaaaat ggtaaggaag tagttgtaac atcagggaaa gatggtcgtt tccgagtggg 180
aggtctagag tatgggacat actatttatg ggagctccaa gctccaactg gttatgttca 240
15 attaacatcg cctgtttcct ttacaatcgg gaaagatact cgtaaggaac tggtaacagt 300
ggttaaaaat aacaagcgac cacggattga tgtgccagat acaggggaag aaaccttgta 360
20 tatcttgatg cttgttgcca tttgttggtt tggtagtggg tattatctta cgaaaaaacc 420
aaataactga tattcaatgt acatcattat gaaaaagata gcaggctgaa gggaagacca 480
25 gagtactctg aggtgatgtt aatcaggaat catggatgat tggcatgaat cacaataacg 540
gatatgagggc tgggcagatt gtgccagcct cattgtgggt tattgtttgt aaaacgatag 600
30 gactgggtctg gtaatcattt taggaatgga caggactggg attctgattt aaaatggatg 660
gtgaatcaga aagaaatgag attttctcgt ttctcttagc agataggatt gtctgttagg 720
35 aaaagcgata aaatgatgag tttgaagata aagggatgct gataaaaatg gtaaaaacaa 780
aaaagcaaaa acgaaataat ctctatttag gagtgggtatt ttctattgga atggcggtta 840
40 tggcgatatcc gctggtgtct cgcttggtatt atcgagtggg atcaaatcaa caaattgctg 900
actttgataa ggaaaaagca acgttggatg aggctgacat tgatgaacga atgaaattgg 960
45 cacaagcctt caatgactct ttgaataatg tagtgagtgg cgatccttgg tcggaagaaa 1020
tgaagaaaaa agggcgagca gagtatgcac gtatgttaga aatccatgag cggatggggc 1080
50 atgtggaaaat ccccggttatt gacgtggatt tgccggttta tgctggtact gctgaagagg 1140
tattgcagca aggggctggg catctagagg gaacttctct gccgatcgga ggcaattcga 1200
55 cccatgcggt gattacggca catacagggt tgccaacagc taagatgttt acggatttga 1260

ES 2 286 133 T3

ccaaacttaa agttggggat aagttttatg tgcacaatat caaggaagtg atggcctatc 1320
 5 aagtggatca agtaaagggtg attgagccga cgaactttga tgattttattg attgtaccag 1380
 gtcattgatta tgtgaccttg ctgacttgta cgccatacat gatcaatacc catcgtctat 1440
 10 tggttcgggg gcatcgata ccgtacgtag cagaggttga ggaagaattt attgcagcaa 1500
 acaaactcag tcatctctat cgctacctgt tttatgtggc agttggtttg attgtgattc 1560
 15 ttttatggat tattcgacgc ttgcgcaaga agaaaaaaca accggaaaag gctttgaagg 1620
 cgctgaaagc agcaaggaag gaagtgaagg tggaggatgg acaacagtag acgttcacga 1680
 20 aaaaaaggca caaaaaagaa gaaacatccg ctgatccttc ttctgatttt cttagtagga 1740
 ttccgcgttg cgatatatcc attggtgtct cgttattatt atcgtattga gtcaaacgag 1800
 gttattaaag agtttgatga gacggtttcc cagatggata aggcagaact tgaggagcgt 1860
 25 tggcgcttgg ctcaagcctt caatgcgacc ttgaaacat ctgaaattct tgatcctttt 1920
 acagagcaag agaaaaagaa aggcgtctca gaatatgcca atatgctaaa ggtccatgag 1980
 30 cggattggct atgtggaaat tcctgcgatt gatcaggaaa ttccgatgta tgcggaacg 2040
 agtgaggaca ttcttcagaa aggggcaggg ctgtagaag gggcttcgct gcctgttga 2100
 35 ggtgaaaata ccatacagt gatcactgct cacagaggat tgccaacggc agaattgttc 2160
 agtcaattgg ataagatgaa aaaaggggat atcttttate ttcacgtttt agatcagggtg 2220
 40 ttggcctacc aagtggatca gatagtgcg gtggagccga atgactttga gcctgtcttg 2280
 attcaacatg gggaagatta tgcgaccttg ttgacttgta caccgtatat gattaacagt 2340
 45 catcgtctgt tggtagctgg gaagcggatt ccgtatacgg caccaattgc agagcggaat 2400
 cgagcggatga gagagcgtgg gcaattcttg ttgtggttat tactaggagc gatggcggtc 2460
 50 atccttctct tgctgtatcg cgtgtatcgt aatcgacgga ttgtcaaagg actagaaaag 2520
 caattggagg ggcgtcatgt caaggactaa actacgagcc ttattgggat acttgttgat 2580
 55 gttggtagcc tgtttgattc ctattttattg ttttgacag atggtgttgc agtctcttgg 2640
 acaggtgaaa ggtcatgcta catttgtgaa atccatgaca actgaaatgt accaagaaca 2700
 60 acagaacat tctc 2714

<210> 23

<211> 297

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

ES 2 286 133 T3

<400> 23

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

55

60

65

ES 2 286 133 T3

	Ile	Gln	His	Gly	Glu	Asp	Tyr	Ala	Thr	Leu	Leu	Thr	Cys	Thr	Pro	Tyr	
	210						215						220				
5	Met	Ile	Asn	Ser	His	Arg	Leu	Leu	Val	Arg	Gly	Lys	Arg	Ile	Pro	Tyr	
	225					230					235					240	
	Thr	Ala	Pro	Ile	Ala	Glu	Arg	Asn	Arg	Ala	Val	Arg	Glu	Arg	Gly	Gln	
10					245					250					255		
	Phe	Trp	Leu	Trp	Leu	Leu	Leu	Gly	Ala	Met	Ala	Val	Ile	Leu	Leu	Leu	
				260					265					270			
15	Leu	Tyr	Arg	Val	Tyr	Arg	Asn	Arg	Arg	Ile	Val	Lys	Gly	Leu	Glu	Lys	
			275					280					285				
20	Gln	Leu	Glu	Gly	Arg	His	Val	Lys	Asp								
	290							295									
	<210> 24																
	<211> 894																
25	<212> ADN																
	<213> <i>Streptococcus pneumoniae</i>																
30	<400> 24																
	atggacaaca gtagacgttc acgaaaaaaaa ggcacaaaaa agaagaaaca tccgctgatac 60																
35	cttcttctga ttttcttagt aggattcgcc gttgcgatat atccattggt gtctcgttat 120																
	tattatcgta ttgagtcaaa cgagggttatt aaagagtttg atgagacggt ttcccagatg 180																
40	gataaggcag aacttgagga gcgttggcgc ttggctcaag ccttcaatgc gaccttgaaa 240																
	ccatctgaaa ttcttgatcc ttttacagag caagagaaaa agaaaggcgt ctccagaatat 300																
45	gccaatatgc taaagggtcca tgagcggatt ggctatgtgg aaattcctgc gattgatcag 360																
	gaaattccga tgtatgtcgg aacgagtgag gacattcttc agaaaggggc agggctgtta 420																
50	gaaggggctt cgctgcctgt tggaggtgaa aatacccata cagtgatcac tgctcacaga 480																
	ggattgccaa cggcagaatt gttcagtc aa ttggataaga tgaaaaaagg ggatatcttt 540																
55	tatcttcacg ttttagatca ggtgttggcc taccaagtgg atcagatagt gacggtggag 600																
	ccgaatgact ttgagcctgt cttgattcaa catggggaag attatgcgac cttgttgact 660																
60	tgtacaccgt atatgattaa cagtcacgt ctgttggtac gtgggaagcg gattccgtat 720																
	acggcaccaa ttgcagagcg gaatcgagcg gtgagagagc gtgggcaatt ctggttgtgg 780																
65	ttattactag gagcgatggc ggtcatcctt ctcttgctgt atcgctgtga tcgtaatcga 840																
	cggattgtca aaggactaga aaagcaattg gaggggcgtc atgtcaagga ctaa 894																

ES 2 286 133 T3

<210> 25

<211> 3010

<212> ADN

5 <213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 25

10 **tgttaggaaa agcgataaaa tgatgagttt gaagataaag ggatgctgat aaaaatggta 60**

 aaaacaaaaa agcaaaaacg aaataatctc ctattaggag tggatatttt cattggaatg 120

15 **gcggtaatgg cgtatccgct ggtgtctcgc ttgtattatc gagtggaatc aaatcaadaa 180**

 attgctgact ttgataagga aaaagcaacg ttggatgagg ctgacattga tgaacgaatg 240

20 **aaattggcac aagccttcaa tgactctttg aataatgtag tgagtggcga tccttggtcg 300**

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 286 133 T3

gaagaaatga agaaaaaagg gcgagcagag tatgcacgta tgtagaaat ccatgagcgg 360
 atggggcatg tggaaatccc cgttattgac gtggatttgc cggtttatgc tggtagtct 420
 5 gaagaggtat tgcagcaagg ggctgggcat ctagaggga cttctctgcc gatcggaggc 480
 aattcgacccc atgcggtgat tacggcacat acaggtttgc caacagctaa gatgtttacg 540
 10 gatttgacca aacttaaagt tggggataag ttttatgtgc acaatatcaa ggaagtgatg 600
 gcctatcaag tggatcaagt aaaggtgatt gagccgacga actttgatga tttattgatt 660
 15 gtaccaggtc atgattatgt gaccttgctg acttgtagc catacatgat caatacccat 720
 cgtctattgg ttcgggggca tcggataccg tacgtagcag aggttgagga agaatttatt 780
 20 gcagcaaaca aactcagtca tctctatcgc tacctgtttt atgtggcagt tggtttgatt 840
 gtgattcttt tatggattat tcgacgcttg cgcaagaaga aaaaacaacc ggaaaaggct 900
 25 ttgaaggcgc tgaaagcagc aaggaaggaa gtgaagggtg aggatggaca acagtagacg 960
 ttcacgaaaa aaaggcacia aaaagaagaa acatccgctg atccttcttc tgattttctt 1020
 30 agtaggattc gccgttgca tatatccatt ggtgtctcgt tattattatc gtattgagtc 1080
 aaacgaggtt attaaagagt ttgatgagac ggtttccag atggataagg cagaacttga 1140
 35 ggagcgttgg cgcttggtc aagccttcaa tgcgacctg aaaccatctg aaattcttga 1200
 tccttttaca gagcaagaga aaaagaaagg cgtctcagaa tatgccaata tgctaaagg 1260
 40 ccatgagcgg attggctatg tggaaattcc tgcgattgat caggaaattc cgatgtatgt 1320
 cggaacgagt gaggacattc ttcagaaagg ggcagggtg ttagaagggg cttcgctgcc 1380
 45 tggttgagggt gaaaataccc atacagtgat cactgctcac agaggattgc caacggcaga 1440
 attgttcagt caattggata agatgaaaaa aggggatatc ttttatcttc acgttttaga 1500
 50 tcaggtgttg gcctaccaag tggatcagat agtgacggtg gagccgaatg actttgagcc 1560
 tgtcttgatt caacatgggg aagattatgc gaccttggtg acttgtagc cgtatatgat 1620
 55 taacagtcac cgtctgttgg tacgtgggaa gcggattccg tatacggcac caattgcaga 1680
 gcggaatcga gcggtgagag agcgtgggca attctggttg tggttattac taggagcgat 1740
 60 ggcggtcatc cttctcttgc tgtatcgctg gtatcgtaat cgacggattg tcaaaggact 1800
 agaaaagcaa ttggaggggc gtcattgcaa ggactaaact acgagcctta ttgggatact 1860
 65

ES 2 286 133 T3

```

tgttgatggt ggtagcctgt ttgattccta tttattgttt tggacagatg gtgttgacgt 1920
ctcttggaca ggtgaaaggt catgctacat ttgtgaaatc catgacaact gaaatgtacc 1980
aagaacaaca gaaccattct ctgcctaca atcaacgctt ggcttcgcaa aatcgcatgt 2040
tagatccttt tttggcggag ggatatgagg tcaattacca agtgtctgac gaccctgatg 2100
cagtctatgg ttacttgtct attccaagtt tggaaatcat ggagccggtt tatttgggag 2160
cagattatca tcatttaggg atgggcttgg ctcatgtgga tggtagaccg ctgcctctgg 2220
atggtacagg gattcgctca gtgattgctg ggcaccgtgc agagccaagc catgtctttt 2280
tccgccattt ggatcagcta aaagttggag atgctcttta ttatgataat ggccaggaaa 2340
ttgtagaata tcagatgatg gacacagaga ttattttacc gtcggaatgg gaaaaattag 2400
aatcggttag ctctaaaaat atcatgacct tgataacctg cgatccgatt cctaccttta 2460
ataaacgctt attagtgaat tttgaacgag tcgctgttta tcaaaaatca gatccacaaa 2520
cagctgcagt tgcgagggtt gcttttacga aagaaggaca atctgtatcg cgtgttgcaa 2580
cctctcaatg gttgtaccgt gggctagtgg tactggcatt tctgggaatc ctgtttgttt 2640
tgtggaagct agcacgttta ctacgagggg aataaaaaga aatgaaagga aagctaaggc 2700
tgttcctttt tccggctctt tgtcaactgt agtgggttga aaaaaagcta agctcgagaa 2760
aggacaaatt ttgtcctttc ttttttgata ttcagagcga taaaaatccg ttttttgaag 2820
ttttcaaagt ttcgaaaacc aaaggcattg cgcttgataa gtttgatgag attattggtc 2880
gcttccagtt tggcattaga atagtgtagt tgaagggcgt tgataacctt ttctttatct 2940
ttgaggaagg ttttaaagac agtctgaaaa ataggatgaa cctgcttaag attgtcctcg 3000
ataagttcga

```

3010

<210> 26

<211> 304

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 26

```

Met Leu Ile Lys Met Val Lys Thr Lys Lys Gln Lys Arg Asn Asn Leu
1           5           10          15

```

ES 2 286 133 T3

	Leu	Leu	Gly	Val	Val	Phe	Phe	Ile	Gly	Met	Ala	Val	Met	Ala	Tyr	Pro	
				20					25					30			
5	Leu	Val	Ser	Arg	Leu	Tyr	Tyr	Arg	Val	Glu	Ser	Asn	Gln	Gln	Ile	Ala	
			35					40					45				
10	Asp	Phe	Asp	Lys	Glu	Lys	Ala	Thr	Leu	Asp	Glu	Ala	Asp	Ile	Asp	Glu	
		50					55					60					
15	Arg	Met	Lys	Leu	Ala	Gln	Ala	Phe	Asn	Asp	Ser	Leu	Asn	Asn	Val	Val	
	65					70					75					80	
20	Ser	Gly	Asp	Pro	Trp	Ser	Glu	Glu	Met	Lys	Lys	Lys	Gly	Arg	Ala	Glu	
					85					90					95		
25	Tyr	Ala	Arg	Met	Leu	Glu	Ile	His	Glu	Arg	Met	Gly	His	Val	Glu	Ile	
				100					105					110			
30	Pro	Val	Ile	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Val	Tyr	Ala	Gly	Thr	Ala	Glu	Glu	
			115					120					125				
35	Val	Leu	Gln	Gln	Gly	Ala	Gly	His	Leu	Glu	Gly	Thr	Ser	Leu	Pro	Ile	
		130					135					140					
40	Gly	Gly	Asn	Ser	Thr	His	Ala	Val	Ile	Thr	Ala	His	Thr	Gly	Leu	Pro	
	145					150					155					160	
45	Thr	Ala	Lys	Met	Phe	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Leu	Lys	Val	Gly	Asp	Lys	
					165					170					175		
50	Phe	Tyr	Val	His	Asn	Ile	Lys	Glu	Val	Met	Ala	Tyr	Gln	Val	Asp	Gln	
				180					185					190			
55	Val	Lys	Val	Ile	Glu	Pro	Thr	Asn	Phe	Asp	Asp	Leu	Leu	Ile	Val	Pro	
			195					200					205				
60	Gly	His	Asp	Tyr	Val	Thr	Leu	Leu	Thr	Cys	Thr	Pro	Tyr	Met	Ile	Asn	
		210					215					220					
65	Thr	His	Arg	Leu	Leu	Val	Arg	Gly	His	Arg	Ile	Pro	Tyr	Val	Ala	Glu	
	225					230					235					240	
70	Val	Glu	Glu	Glu	Phe	Ile	Ala	Ala	Asn	Lys	Leu	Ser	His	Leu	Tyr	Arg	
					245					250				255			
75	Tyr	Leu	Phe	Tyr	Val	Ala	Val	Gly	Leu	Ile	Val	Ile	Leu	Leu	Trp	Ile	
				260					265				270				
80	Ile	Arg	Arg	Leu	Arg	Lys	Lys	Lys	Lys	Gln	Pro	Glu	Lys	Ala	Leu	Lys	
				275				280					285				
85	Ala	Leu	Lys	Ala	Ala	Arg	Lys	Glu	Val	Lys	Val	Glu	Asp	Gly	Gln	Gln	
		290					295					300					

ES 2 286 133 T3

<210> 27

<211> 915

<212> ADN

5 <213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 27

```

10      atgctgataa aaatggtaaa aacaaaaaag caaaaacgaa ataatctcct attaggagtg 60
      gtatTTTTtca ttggaatggc ggtaatggcg tatccgctgg tgtctcgctt gtattatcga 120
      gtggaatcaa atcaacaaat tgctgacttt gataaggaaa aagcaacggt ggatgaggct 180
15      gacattgatg aacgaatgaa attggcacia gccttcaatg actctttgaa taatgtagtg 240
      agtggcgatc cttggtcgga agaaatgaag aaaaaagggc gagcagagta tgcacgtatg 300
20      ttagaaatcc atgagcggat ggggcattgt gaaatccccg ttattgacgt ggatttgccg 360
      gtttatgctg gtactgctga agaggatttg cagcaagggg ctgggcatct agagggaaact 420
25      tctctgccga tcggaggcaa ttcgacccat gcggtgatta cggcacatac aggtttgccca 480
      acagctaaga tgtttacgga tttgaccaa cttaaagttg gggataagtt ttatgtgcac 540
30      aatatcaagg aagtgatggc ctatcaagtg gatcaagtaa aggtgattga gccgacgaac 600
      tttgatgatt tattgattgt accaggatcat gattatgtga ccttgctgac ttgtacgcea 660
35      tacatgatca atacccatcg tctattgggt cgggggcatc ggataccgta cgtagcagag 720
      gttgaggaag aattttattgc agcaaacaaa ctcagtcatc tctatcgcta cctgttttat 780
40      gtggcagttg gtttgattgt gattctttta tggattattc gacgcttgcg caagaagaaa 840
      aaacaaccgg aaaaggcttt gaaggcgctg aaagcagcaa ggaaggaagt gaaggaggag 900
45      gatggacaac agtag
                                           915

```

<210> 28

<211> 2199

<212> ADN

<213> *Enterococcus faecalis*

55

60

65

ES 2 286 133 T3

<400> 28

actaaaaattc gtttacttta tgcatttaaa tgaaaaagca gatcctacga aaggctttaa 60
5 aaatgaggcg aatgttgata acggtcatac cgacgaccaa acaccaccaa ctgttgaagt 120
tgtgacaggt gggaaacggt tcattaaagt cgatggcgat gtgacagcga cacaagcctt 180
10 ggcgggagct tcctttgtcg tccgtgatca aaacagcgac acagcaaatt atttgaaaat 240
cgatgaaaca acgaaagcag caacttgggt gaaaacaaaa gctgaagcaa ctacttttac 300
15 aacaacggct gatggattag ttgatatcac agggcttaaa tacgggtacct attatttaga 360
agaaactgta gctcctgatg attatgtctt gttaacaaat cggattgaat ttgtgggtcaa 420
20 tgaacaatca tatggcacia cagaaaacct agtttcacca gaaaaagtac caaacaacaa 480
caaaggtacc ttaccttcaa cagggtggcaa aggaatctac gtttacttag gaagtggcgc 540
25 agtcttgcta cttattgcag gagtctactt tgctagacgt agaaaagaaa atgcttaatt 600
tctagcatca ccgaagaaat ttttagaaaa acaaagagcc tgggccaatc actgtcccag 660
30 gctctcatgc tttattttta aggaggaagc aatgaagtca aaaaagaaac gtcgtatcat 720
tgatggtttt atgattcttt tactgattat tggaataggt gcatttgctt atccttttgt 780
35 tagcgatgca ttaaataact atctggatca acaaattatc gctcattatc aagcaaaagc 840
aagccaagaa aacaccaaag aaatggctga acttcaagaa aaaatggaaa agaaaaacca 900
40 agaattagcg aaaaaaggca gcaatcctgg attagatcct ttttctgaaa cgcaaaaaac 960
aacgaaaaaa ccagacaaat cctattttga aagtcatacg attgggtgtt taaccattcc 1020
45 aaaaataaat gtccgtttac caattttga taaaacgaat gcattgctat tggaaaaagg 1080
aagctccttg ttagaaggaa cctcctatcc tacagggtgt acgaatacac atgcgggtcat 1140
50 ttcaggccat cgtgggtctc ctcaagcaa attatttaca gatttgccag aattaaaaaa 1200
aggcgatgaa ttttatatcg aagtcaatgg gaagacgctt gcttatcaag tagatcaaat 1260
55 aaaaaccggt gaaccaactg atacaaaaga tttacacatt gagtctggcc aagatctcgt 1320
cactttatta acttgcacac cgtatatgat aaacagtcac cggttattag ttcgaggaca 1380
60 tcgtatccca tatcaaccag aaaaagcagc agcgggggatg aaaaaagtgg cacaacaaca 1440
aaatttacta ttatggacat tacttttaat tgctgtgtcg ttaattatta gcggcttcat 1500
65

ES 2 286 133 T3

tatctggtac aagcgacgga aaaagacgac cagaaaacca aagtagtatg acgaaaaggc 1560
 taaacatact aaaaaaaaga gtaaaaaaat agcttttcaa tttttaatcc tccttatcgt 1620
 gcataattga accagagaaa cagaagtatt aacgaaataa ctaaaagagc aagccctgaa 1680
 taaaaagcga caaagggcca atcaatcgac tgtttaaatt cctgccaaagt ttggattttt 1740
 ctgttttttt tcgcgctatc ctcaagcgtg agtaaataat tcaatagtaa gaggagtagc 1800
 aacaccgtga aatcatttgt ggtaaaaagc acatgtaaaa atagaatgac aaagacaaca 1860
 cgggataaca ctcgattccg caaaattaaa aataacttag cacgcataat aaaccaccat 1920
 ttcttatcag agataatgaa tctgtttttg tctactcttt agttatatca taaaattctt 1980
 aataatgaaa aaatgactcg agaaaataat tgaaaaaagt tttttttcct gaatcattat 2040
 tttcgtaaat aaagaataaa cgtgttactc ttggcttatt aaatttggaa ggagtgttaa 2100
 aaatgaaata tctggatatt attgctttaa ttttattgat tgtcggaggt ttaaactggt 2160
 tattagttgg tgcatttaat tttgatttag ttgcaacaa 2199

<210> 29

<211> 284

<212> PRT

<213> *Enterococcus faecalis*

<400> 29

Met	Lys	Ser	Lys	Lys	Lys	Arg	Arg	Ile	Ile	Asp	Gly	Phe	Met	Ile	Leu
1				5					10					15	
Leu	Leu	Ile	Ile	Gly	Ile	Gly	Ala	Phe	Ala	Tyr	Pro	Phe	Val	Ser	Asp
			20					25					30		
Ala	Leu	Asn	Asn	Tyr	Leu	Asp	Gln	Gln	Ile	Ile	Ala	His	Tyr	Gln	Ala
		35					40					45			
Lys	Ala	Ser	Gln	Glu	Asn	Thr	Lys	Glu	Met	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Lys
	50					55				60					
Met	Glu	Lys	Lys	Asn	Gln	Glu	Leu	Ala	Lys	Lys	Gly	Ser	Asn	Pro	Gly
65				70					75					80	
Leu	Asp	Pro	Phe	Ser	Glu	Thr	Gln	Lys	Thr	Lys	Lys	Pro	Asp	Lys	
			85					90					95		

ES 2 286 133 T3

Ser Tyr Phe Glu Ser His Thr Ile Gly Val Leu Thr Ile Pro Lys Ile
 100 105 110
 Asn Val Arg Leu Pro Ile Phe Asp Lys Thr Asn Ala Leu Leu Leu Glu
 115 120 125
 Lys Gly Ser Ser Leu Leu Glu Gly Thr Ser Tyr Pro Thr Gly Gly Thr
 130 135 140
 Asn Thr His Ala Val Ile Ser Gly His Arg Gly Leu Pro Gln Ala Lys
 145 150 155 160
 Leu Phe Thr Asp Leu Pro Glu Leu Lys Lys Gly Asp Glu Phe Tyr Ile
 165 170 175
 Glu Val Asn Gly Lys Thr Leu Ala Tyr Gln Val Asp Gln Ile Lys Thr
 180 185 190
 Val Glu Pro Thr Asp Thr Lys Asp Leu His Ile Glu Ser Gly Gln Asp
 195 200 205
 Leu Val Thr Leu Leu Thr Cys Thr Pro Tyr Met Ile Asn Ser His Arg
 210 215 220
 Leu Leu Val Arg Gly His Arg Ile Pro Tyr Gln Pro Glu Lys Ala Ala
 225 230 235 240
 Ala Gly Met Lys Lys Val Ala Gln Gln Gln Asn Leu Leu Leu Trp Thr
 245 250 255
 Leu Leu Leu Ile Ala Cys Ala Leu Ile Ile Ser Gly Phe Ile Ile Trp
 260 265 270
 Tyr Lys Arg Arg Lys Lys Thr Thr Arg Lys Pro Lys
 275 280
 <210> 30
 <211> 855
 <212> ADN
 <213> *Enterococcus faecalis*
 <400> 30
 atgaagtcaa aaaagaaacg tcgtatcatt gatgggtttta tgattctttt actgattatt 60
 ggaataggtg catttgcgta tccttttggt agcgatgcat taaataacta tctggatcaa 120
 caaattatcg ctctattatca agcaaaagca agccaagaaa acaccaaaga aatggctgaa 180
 cttcaagaaa aaatggaaaa gaaaaaccaa gaattagcga aaaaaggcag caatcttgga 240

ES 2 286 133 T3

ttagatcctt tttctgaaac gcaaaaaaca acgaaaaaāc cagacaaatc ctatitttgaa 300
 agtcatacga ttgggtgtttt aaccattcca aaaataaatg tccgtttacc aatttttgat 360
 5 aaaacgaatg cattgctatt ggaaaaagga agctccttgt tagaaggaac ctctatect 420
 acaggtggta cgaatacaca tgcggtcatt tcaggccatc gtgggtctccc tcaagccaaa 480
 10 ttatttacag atttgccaga attaaaaaaa ggcgatgaat tttatatcga agtcaatggg 540
 aagacgcttg cttatcaagt agatcaaata aaaaccgttg aaccaactga tacaaaagat 600
 15 ttacacattg agtctggcca agatctcgtc actttattaa cttgcacacc gtatatgata 660
 aacagtcatc gggtattagt tcgaggacat cgtatcccat atcaaccaga aaaagcagca 720
 20 gcggggatga aaaaagtggc acaacaacaa aatttactat tatggacatt acttttaatt 780
 gcctgtgcgt taattattag cggcttcatt atctggtaca agcgacggaa aaagacgacc 840
 25 agaaaaccaa agtag 855

<210> 31

30 <211> 2687

<212> ADN

<213> *Corynebacterium diphtheriae*

35 <400> 31

gtgggtccgga gtatgacaag aacgctccgg ttcaggtaaa cggcactggg aacggtaacg 60
 40 atctcgtggg cacctctgac aagaacggca acgtccactt cgagggcctg ttcgtctccg 120
 acgaccagaa tgatccgga aagtcagctg cgcagcgtg ctacgtcctc gtcgagaccg 180
 45 agggcccgac gggcttcgtt actccgaaag atgggacggg cttcccagtt gctgtaaaga 240
 ttggacagac tgctaccact acctacgacg caaaggtcga gaacgtcaag cgcgataccc 300
 50 ctgacctgcc gctgaccggg ggcaaggggt tgctgttcct gatgattgcc ggtgggtctgt 360
 tgctgctggg tgctgttggg gctggtttcg tctttgtacg ccgtatcaac gagtaattga 420
 55 tttgtcgcgt gattaaataa tcgcgttcgc cgcaccaatg cagggcatca aatgccccgc 480
 cggcggggcat aaacgccggc ggggtgcggg ggctttccac cgcaccccca cattctttgt 540

60

65

ES 2 286 133 T3

cagagatttg ctgtttggcc tgtgccaccc ggcatcccc tatatgagaa acggacgtac 600
5 ctgtcatggt taccaccgcg tcaccgcgct ctaccggacc ggataacca gacgcgcaac 660
caaagcgtcg ttgggtcttt tccggactcg cattgtttgc gtgtataacg gcgctagccg 720
gcctcatggt ggggttgat ccatctactg cagcgtggt taacgccgc gaacaggcca 780
10 aactggtaga tctctatgat tccaaaattg aaaatgcaac ccctcttagc gcggaacaat 840
tacttgaact cgcgcaccgt tataacgacc gcctgaccgt aggcgctgct ctcgatccct 900
15 gggctaacgt ccccgcgga gcgggcaaag aagacggcga cggtatggc tataaagacc 960
agttgcgtgt tgaccgtacg gatgtcatgg ctctatacgt tatcccctct atcaagggtg 1020
20 atctaccgat ctatcacggc acgagcgata acactctaaa gaaggcgct ggccatttgg 1080
aaggtaacct gttaccggtg ggaggaccac gcaccattc cgttatcact gcacaccgtg 1140
25 gcttagctga ggcaccatg ttcactaatc tcaacaagg tgggtaggg gatagattca 1200
ccattgaggt gatgggcga gtccttacgt atgaagtgcg tgaaactcgt gtggtcagcc 1260
30 cagaggacac taggttcctg caaactcaag acgatcgtga ccttgtcaca ctcgttactt 1320
gtactccgtt gggcatcaat acacatcgca ttctggtgac agctgagcgc attactccca 1380
35 ccccgcaatc cgatatcgat gcagcacgtc aagcttcca aatcggttc ccttggtggg 1440
cggtcatttt cgcagtggga tttagcttta tcgccttgtt cttctggcgt tcgggttaca 1500
tgattcctcc aaagaagaag gaagaagaca tcgaaagcga agctgatggc gatgaactct 1560
40 gaaacggcgg ggaaggaacc caacgtggtc agtaccgacg ctaaactc caccggtacc 1620
agttccaatg cgggtaccg tgagagctca gcgaaaaaga aagcgagac ggcaattgct 1680
45 gcgatagtca tgcttttgtg cggactgtta gggctggtga ttctgttcta tccagtcgtg 1740
tccactcaac ttaacaatta tgaacagtct aaactcgccc gacagtttg tgcagacgt 1800
50 gcccaagctg accctgccgt agttgctgct gctcttgatg ctgccatgc ctacaacgat 1860
tcgctagaaa atggaccct gcaggatccg tggaccggtg gagatagcac taaggatcct 1920
55 gcctatcagg catacgagaa actcttaggg gaatatccg cgatggctca gatctctatc 1980
ccggctattt ccgtgaacct tccatttac caccggacaa gcgacgccac actcctcaaa 2040
60 ggtgttgggc acctttacgg tactgcgcta cccgttggg gactggggac gcgttcggtt 2100
ctaacagcgc attcaggtat ccaaaaatcg accttctttg acaatttaga aaagggtcaaa 2160

65

ES 2 286 133 T3

```

aagggtgacg ccatttatgt acgcaatatt ggtgagaccc tgaataacca agtacgcgac 2220
atcgaaatca tccgtccagc ggagattgac cgtatccagc caatcccaga ccgagactta 2280
attaccctcg tgacctgtac accctatgga atcaataccc ataggctttt ggttactgcc 2340
gaacgtgtcc ctatggaacc cggtagggcg gaccgtgcat ttgccggtga cggaattgtc 2400
tggcagtggg ggatgaagct agctatcggg gtgttggtgg tcatccttct cctaactggg 2460
tggctcatta tccgtatttt gcgagctagg aaattcgca agaaaacagc tggagcagac 2520
gctgctaaat ctgttgaacc tggatgatatt gaggcgtcgc taagcgcttc agcggccgag 2580
gagtcaccagt aatatgcaga aaccaatttc cccaacacat gcaaacaccc aagcagtcgc 2640
ccattcctga aaggacgccc tactatgaag aagactcact tgttccg 2687

```

<210> 32

<211> 348

<212> PRT

<213> *Corynebacterium diphtheriae*

<400> 32

```

Met Ala Met Asn Ser Glu Thr Ala Gly Lys Glu Pro Asn Val Val Ser
 1           5           10           15

Thr Asp Ala Lys His Ser Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ala Gly Thr Gly
          20           25           30

Glu Ser Ser Ala Lys Lys Lys Ala Gln Thr Ala Ile Ala Ala Ile Val
          35           40           45

Met Leu Leu Cys Gly Leu Leu Gly Leu Val Ile Leu Phe Tyr Pro Val
          50           55           60

Val Ser Thr Gln Leu Asn Asn Tyr Glu Gln Ser Lys Leu Ala Arg Gln
          65           70           75           80

Phe Gly Ala Asp Ala Ala Gln Ala Asp Pro Ala Val Val Ala Ala Ala
          85           90           95

Leu Asp Ala Ala His Ala Tyr Asn Asp Ser Leu Glu Asn Gly Pro Leu
          100          105          110

Gln Asp Pro Trp Thr Gly Gly Asp Ser Thr Lys Asp Pro Ala Tyr Gln

```

ES 2 286 133 T3

	Ala	Tyr	Glu	Lys	Leu	Leu	Gly	Glu	Tyr	Pro	Ala	Met	Ala	Gln	Ile	Ser	
	130						135					140					
5	Ile	Pro	Ala	Ile	Ser	Val	Asn	Leu	Pro	Ile	Tyr	His	Gly	Thr	Ser	Asp	
	145					150					155					160	
10	Ala	Thr	Leu	Leu	Lys	Gly	Val	Gly	His	Leu	Tyr	Gly	Thr	Ala	Leu	Pro	
					165					170					175		
	Val	Gly	Gly	Leu	Gly	Thr	Arg	Ser	Val	Leu	Thr	Ala	His	Ser	Gly	Ile	
15				180				185						190			
	Gln	Lys	Ser	Thr	Phe	Phe	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Val	Lys	Lys	Gly	Asp	
			195				200						205				
20	Ala	Ile	Tyr	Val	Arg	Asn	Ile	Gly	Glu	Thr	Leu	Lys	Tyr	Gln	Val	Arg	
	210					215						220					
25	Asp	Ile	Glu	Ile	Ile	Arg	Pro	Ala	Glu	Ile	Asp	Arg	Ile	Gln	Pro	Ile	
	225					230					235					240	
	Pro	Asp	Arg	Asp	Leu	Ile	Thr	Leu	Val	Thr	Cys	Thr	Pro	Tyr	Gly	Ile	
30				245						250					255		
	Asn	Thr	His	Arg	Leu	Leu	Val	Thr	Ala	Glu	Arg	Val	Pro	Met	Glu	Pro	
				260					265					270			
35	Gly	Glu	Ala	Asp	Arg	Ala	Phe	Ala	Gly	Asp	Gly	Ile	Val	Trp	Gln	Trp	
			275				280						285				
40	Trp	Met	Lys	Leu	Ala	Ile	Gly	Val	Leu	Val	Val	Ile	Leu	Leu	Leu	Thr	
	290					295						300					
	Gly	Trp	Leu	Ile	Ile	Arg	Ile	Leu	Arg	Ala	Arg	Lys	Phe	Ala	Lys	Lys	
45	305				310					315					320		
	Thr	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Ala	Lys	Ser	Val	Glu	Pro	Gly	Asp	Ile	Glu	
				325				330						335			
50	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Glu	Glu	Ser	Gln					
			340					345									

55 <210> 33
 <211> 1047
 <212> ADN
 <213> *Corynebacterium diphtheriae*

60

65

ES 2 286 133 T3

<400> 33

```

5      atggcgatga actctgaaac ggcggggaag gaaccaacg tggtcagtac cgacgctaaa 60
      cactccaccg gtaccagttc caatgcgggt accggtgaga gctcagcgaa aaagaaagcg 120
      cagacggcaa ttgctgcgat agtcatgctt ttgtgcggac tgtagggct ggtgattctg 180
10     ttctatccag tcgtgtccac tcaacttaac aattatgaac agtctaaact cgcccgcag 240
      tttggtgcag acgctgccca agctgaccct gccgtagttg ctgctgctct tgatgctgcc 300
15     catgcctaca acgattcgct agaaaatgga cccctgcagg atccgtggac cggaggagat 360
      agcactaagg atcctgccta tcaggcatac gagaaactct taggggaata tccggcgatg 420
20     gctcagatct ctatcccggc tatttccgtg aaccttccca ttaccacgg gacaagcgac 480
      gccacactcc tcaaaggtgt tgggcacctt tacggtactg cgctaccctg tggaggactg 540
25     gggacgcgtt cggttctaac agcgcatcca ggtatccaaa aatcgacctt ctttgacaat 600
      ttagaaaagg tcaaaaaggg tgacgccatt tatgtacgca atattggtga gacctgaaa 660
30     taccaagtac gcgacatcga aatcatccgt ccagcggaga ttgaccgtat ccagccaatc 720
      ccagaccgag acttaattac cctcgtgacc tgtacacct atggaatcaa taccatagg 780
35     cttttggtta ctgccgaacg tgtccctatg gaacccggtg aggcggaccg tgcatttgcc 840
      ggtgacggaa ttgtctggca gtggtggatg aagctagcta tcggtgtgtt ggtggtcatc 900
40     cttctcctaa ctgggtggct cattatccgt attttgcgag ctaggaaatt cgcaagaaa 960
      acagctggag cagacgctgc taaatctgtt gaacctggtg atattgaggc gtcgctaagc 1020
45     gcttcagcgg ccgaggagtc ccagtaa
                                     1047

```

50 <210> 34

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Consenso/*Streptococcus pyogenes*

<220>

60

<223> X en posición 12 puede ser asimismo S/T.

<220>

<223> X en posición 18 puede ser asimismo R/K.

65

ES 2 286 133 T3

<400> 34

Thr Leu Leu Thr Cys Thr Pro Tyr Met Ile Asn Xaa His Arg Leu Leu
1 5 10 15
5 Val Xaa Gly

<210> 35

10 <211> 19

<212> PRT

<213> *Corynebacterium diphtheriae*

15 <400> 35

Thr Leu Val Thr Cys Thr Pro Tyr Gly Ile Asn Thr His Arg Leu Leu
1 5 10 15
20 Val Thr Ala

<210> 36

25 <211> 19

<212> PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

30 <400> 36

Thr Leu Val Thr Cys Thr Pro Tys Gly Val Asn Thr Lys Arg Leu Leu
1 5 10 15
35 Val Arg Gly

<210> 37

40 <211> 150

<212> PRT

<213> *Streptococcus pyogenes*

45 <400> 37

Ile Glu Asn Asn Asp Ile Met Gly Tyr Val Glu Val Pro Ser Ile Lys
1 5 10 15
50 Val Thr Leu Pro Ile Tyr His Tyr Thr Thr Asp Glu Val Leu Thr Lys
20 25 30
55 Gly Ala Gly His Leu Phe Gly Ser Ala Leu Pro Val Gly Gly Asp Gly
35 40 45

60

65

ES 2 286 133 T3

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