

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 281**

51 Int. Cl.:
C07K 14/315 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07875131 .0**
96 Fecha de presentación: **11.06.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2054431**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.05.2009**

54 Título: **CONFÓRMEROS DE ADHESINAS BACTERIANAS.**

30 Prioridad:
09.06.2006 US 812145 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.12.2011

73 Titular/es:
**NOVARTIS AG
LICHTSTRASSE 35
4056 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
**MAIONE, Domenico;
NORAIS, Nathalie;
GRANDI, Guido y
NARDI-DEI, Vincenzo**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 370 281 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Confórmers de adhesinas bacterianas

Campo de la invención

5 La invención se refiere a confórmers de adhesinas bacterianas aisladas o purificadas, preferentemente con estabilidad y/o inmunogenicidad mejoradas. En un aspecto preferido, la invención comprende un confórmero F de adhesina bacteriana aislada, en el que la adhesina bacteriana aislada es GB580.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas son polímeros biológicos que se pliegan en estructuras tridimensionales complejas. La jerarquía clásica de la estructura de las proteínas tiene cuatro niveles que incluyen: (i) la estructura primaria - la secuencia de aminoácidos que constituye la proteína, (ii) la estructura secundaria - la estructura tridimensional local del esqueleto peptídico que puede incluir hélices alfa, láminas beta, hélices 3_{10} y hélices pi, (iii) la estructura terciaria - la estructura tridimensional global de la proteína completa o subunidad de la proteína (es decir, todos los átomos), y (iv) la estructura cuaternaria - la relación tridimensional de subunidades o proteínas en un complejo de proteínas. Cada proteína puede existir en múltiples conformaciones (o "confórmers") dependiendo de las condiciones locales y los múltiples confórmers pueden coexistir en equilibrio. El ejemplo más simple de confórmers de proteínas son las conformaciones plegadas y desplegadas de una proteína. Muchas proteínas tienen múltiples conformaciones plegadas. Por ejemplo, alfa- y beta-tubulina son subunidades que se pueden polimerizar para formar microtúbulos. Esta polimerización cambia la estructura cuaternaria de la tubulina y, por lo tanto, representa un confórmero alternativo de tubulina. Además, determinadas proteínas tienen conformaciones con estructuras secundarias diferentes tales como determinadas proteínas amiloides que se convierten de proteínas solubles con estructura secundaria predominantemente alfa-helicoidal a fibrillas largas, insolubles con estructura secundaria predominantemente beta-laminar.

25 Cuando se purifican proteínas de un organismo huésped, a menudo es difícil separar los diferentes confórmers de una proteína dado que las propiedades físicas de los diferentes confórmers son muy similares. Cuando se trata de la expresión de proteínas heterólogas, esto se puede exacerbar por el hecho de que el organismo heterólogo puede carecer de chaperoninas necesarias que ayudan en el plegamiento, de enzimas que modifican post-traduccionamente la proteína, y otros co-factores que ayudan con la interconversión entre confórmers, tales como cinasas que añaden grupos fosfato a la proteína para cambiar de una forma inactiva a una activa o viceversa. Los posibles problemas incluyen el mal plegamiento de las proteínas, la inestabilidad, la insolubilidad (formación de los denominados cuerpos de inclusión), y la incapacidad de generar determinados confórmers sin la co-expresión de co-factores. Incluso cuando el organismo heterólogo puede expresar el confórmero de interés, también puede expresar otros confórmers que son difíciles de separar del confórmero de interés dadas las propiedades biofísicas similares.

35 La conformación de la proteína es especialmente relevante para la producción de proteínas terapéuticas y proteínas componentes de vacunas. En el descubrimiento temprano del alto rendimiento y en la producción de alto rendimiento de proteínas terapéuticas candidatas o de candidatas para vacunas recombinantes, ya se usan ampliamente sistemas de expresión basados en *E. coli*. Las principales ventajas de estos sistemas son la velocidad, la simplicidad y el bajo coste de la producción de proteínas recombinantes junto con un conocimiento extenso de los procesos celulares básicos de este huésped. Esto último permite la manipulación fácil de la expresión de proteínas y proporciona los medios para la interferencia operativa para mejorar el rendimiento y la calidad de las proteínas que se van a expresar. Sin embargo, a pesar de lo general, la similitud en la biosíntesis de las proteínas para todas las especies vivas, *E. coli* no es un huésped universal que pueda producir grandes cantidades de cada proteína derivada de otras especies debido a las diferencias entre la maquinaria traduccional y/o post-traducciona que pueden afectar a las conformaciones de proteínas producidas como se discute anteriormente.

45 Las dificultades en la expresión y en la purificación de proteínas en las conformaciones deseadas son especialmente importantes para proteínas que se van a usar como componentes para vacunas. La antigenicidad de una proteína no depende necesariamente de la estructura tridimensional de una proteína, como cuando se encuentran porciones antigénicas de una proteína en una región de bucle que no depende de la estructura tridimensional global o como cuando la antigenicidad relevante radica en la presentación de fragmentos peptídicos por moléculas MHC. Sin embargo, en algunos casos, las propiedades antigénicas de un antígeno dependen de la forma tridimensional que se puede encontrar sólo en una o en un número limitado de las conformaciones de la proteína. Por lo tanto, para maximizar la antigenicidad de estos componentes de vacunas de proteínas, se necesita identificar la conformación o conformaciones que son las más antigénicas y determinar protocolos para la purificación o el aislamiento de la preparación de la proteína que está enriquecida en la conformación o conformaciones deseadas.

55 Para el desarrollo de vacunas, una clase de antígenos particularmente preferida está representada por la clase de adhesinas. Las adhesinas son un grupo de antígenos expuestos en superficie que están implicados en la adhesión y colonización de tejidos del huésped.

Los solicitantes han identificado previamente locus de islas de adhesina dentro del genoma de *Streptococcus*

agalactiae ("GBS"). Los polipéptidos codificados por estos locus son útiles en composiciones para el tratamiento o la prevención de infección por GBS. Se han identificado secuencias similares en otras bacterias Gram positivas y se pueden usar en composiciones inmunogénicas para el tratamiento o la prevención de infección de bacterias Gram positivas. La proteína de superficie de isla de adhesina identificada normalmente está ensamblada en estructuras poliméricas de alto peso molecular tales como pilosidades. GBS 80, una de las adhesinas identificadas en GBS, demostró ser altamente protectora en estudios inmunológicos.

El GBS se ha revelado en los últimos 20 años como la causa principal de sepsis neonatal y meningitis que afecta a 0,5-3 de cada 1000 nacidos vivos, y una causa importante de morbilidad entre el grupo de edad avanzada que afecta a 5-8 de cada 100.000 de la población. Las estrategias actuales en la gestión de enfermedades se basan en antibióticos durante el parto y en monitorización neonatal, lo que ha reducido la mortalidad en casos neonatales desde >50% en los años 70 a menos de un 10% en los años 90. Sin embargo, todavía existe una morbilidad y una mortalidad considerables y la gestión es cara. Un 15-35% de las mujeres embarazadas son portadoras asintomáticas y tienen un alto riesgo de transmitir la enfermedad a sus bebés. El riesgo de infección neonatal está asociado con pocos anticuerpos maternos específicos de serotipo y se cree que altas títulos son protectores. Además, la enfermedad invasiva por GBS está cada vez más reconocida en adultos ancianos con enfermedad subyacente, tal como diabetes y cáncer.

La "B" en "GBS" se refiere a la clasificación de Lancefield, que se basa en la antigenicidad de un carbohidrato que es soluble en ácido diluido y se denomina el carbohidrato C. Lancefield identificó 13 tipos de carbohidrato C, designados de A a O, que podían diferenciarse serológicamente; los organismos que infectan más comúnmente a seres humanos se encuentran en los grupos A, B, D, y G. Dentro del grupo B, las cepas se pueden dividir, al menos, en 9 serotipos (Ia, Ib, Ia/c, II, III, IV, V, VI, VII y VIII) basándose en la estructura de cápsula polisacárida. En el pasado, los serotipos Ia, Ib, II, y III eran igualmente frecuentes en el transporte vaginal normal y en sepsis de inicio temprano en recién nacidos. Sin embargo, el GBS de tipo V se ha revelado como una causa importante de infección por GBS en los Estados Unidos, y las cepas de los tipos VI y VIII se han vuelto frecuentes entre las mujeres japonesas.

Se ha publicado la secuencia de genoma de una cepa de serotipo V 2603 V/R (Tettelin y cols. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 10.1 073/pnas. 182380799) y se han identificado determinados polipéptidos para su uso como antígenos de vacunas (WO02/34771). Sin embargo, actualmente las vacunas en ensayos clínicos se basan en antígenos de polisacáridos. Estos sufren especificidad de serotipo e inmunogenicidad deficiente, por lo que existe una necesidad de proporcionar vacunas eficaces frente a una infección por *S. agalactiae*. El documento WO 05/028618 describe composiciones de vacuna que comprenden combinaciones de antígenos de GBS que incluyen GBS80.

Es un objeto de la invención proporcionar composiciones adicionales y mejoradas para proporcionar inmunidad frente a la enfermedad y/o la infección de bacterias patógenas, incluyendo *S. agalactiae*. En un aspecto de la invención, las composiciones se basan en el aislamiento de confómeros de adhesina que poseen estabilidad, conformación e inmunogenicidad mejoradas, y su uso en composiciones terapéuticas o profilácticas.

Sumario de la invención

La presente solicitud identifica un problema (que las adhesinas bacterianas se expresan en múltiples conformaciones que tienen diferentes antigenicidades) y además proporciona la solución proporcionando procedimientos para el aislamiento y la interconversión de los confómeros. Por lo tanto en una forma amplia, se puede decir que un aspecto de la invención reside en las isoformas de GBS80 que preferentemente tienen estabilidad y/o inmunogenicidad mejoradas.

Esta isoforma preferida, denominada en el presente documento "confómero F", tiene propiedades estructurales distinguibles y se puede aislar de otras isoformas asociadas a través de diferentes técnicas cromatográficas. Se puede separar GBS 80, un miembro representativo de la familia de adhesinas de *S. agalactiae*, en una de las dos isoformas, a través de cromatografía de intercambio aniónico. De forma específica, el confómero más estable F se purifica a partir de la isoforma menos estable "confómero A" por su incapacidad para quedar retenido en una columna de intercambio iónico de Q-sefariosa mientras está retenido por hidroxapatita. En una realización, un confómero F de GBS 80 purificado se caracteriza porque se separa fácilmente como una banda única en una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio sin desnaturalización (SDS-PAGE). En otra realización, se eluye un confómero F de GBS 80 aislada como un pico monodisperso único por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). En otra realización, un confómero F de GBS 80 aislado muestra un incremento en la resistencia a la digestión por proteasas sobre el confómero A.

Un aspecto de la presente invención proporciona GBS80 aisladas y/o separadas que comprenden confómero F o confómero A, en la que preferentemente el confómero de GBS80 puede generar una respuesta inmunitaria en un sujeto. En realizaciones preferidas, la adhesina bacteriana será un homólogo de GBS80, o más preferentemente un ortólogo o un parólogo. Preferentemente, la homología de este homólogo, ortólogo o parólogo será al menos aproximadamente de una identidad del 60%, al menos aproximadamente de una identidad del 70%, al menos aproximadamente de una identidad del 80%, al menos aproximadamente de una identidad del 85%, al menos aproximadamente de una identidad del 90%, al menos aproximadamente de una identidad del 92,5%, al menos

aproximadamente de una identidad del 95%, al menos aproximadamente de una identidad del 96%, al menos aproximadamente de una identidad del 97%, al menos aproximadamente de una identidad del 98% o al menos aproximadamente de una identidad del 99%. En distintas realizaciones, la GBS80 se puede producir de forma recombinante, preferentemente por la expresión bacteriana tal como la expresión de *E. coli*. En algunas realizaciones, la GBS80 en el confórmero F puede tener una o más de las siguientes características: no quedar retenida en una columna Q-sefarosa, quedar retenida por una columna de hidroxapatita, desplazarse como una banda única con menor peso molecular aparente sobre SDS-PAGE en ausencia de desnaturalización por calor cuando se compara con la adhesina bacteriana después de desnaturalización por calor, siendo más resistente a la digestión por proteasas que GBS80 en el confórmero A, y eluir desde una cromatografía en columna de exclusión por tamaño como un pico monodisperso único. En realizaciones preferidas, el confórmero de GBS80 estará sustancialmente libre de otros confórmeros incluyendo a modo de ejemplo, pero sin limitación, la GBS80 en el confórmero F sustancialmente libre de GBS80 en el confórmero A, que preferentemente, será al menos menor de aproximadamente un 20% del confórmero A, al menos menor de aproximadamente un 15% del confórmero A, al menos menor de aproximadamente un 10% de otros confórmeros, al menos aproximadamente un 5% de otros confórmeros, al menos aproximadamente un 2% de otros confórmeros, o al menos aproximadamente un 1% de otros confórmeros de la proteína. En otras realizaciones, la GBS80 puede no estar totalmente libre del otro confórmero incluyendo, a modo de ejemplo, la GBS80 en el confórmero F puede tener entre aproximadamente un 20% y aproximadamente un 1%, entre aproximadamente un 15% y aproximadamente un 1%, entre aproximadamente un 10% y aproximadamente un 1%, entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 1%, o entre aproximadamente un 2% y aproximadamente un 1% de GBS80 en el confórmero A.

En realizaciones preferidas, la GBS80 de la presente invención podrá generar una respuesta inmunitaria en un organismo diana tal como un ave o un mamífero, preferentemente un sujeto humano. Más preferentemente, la GBS80 proporcionará una inmunidad pasiva y/o inmunidad activa al organismo diana.

En algunas realizaciones, las composiciones de GBS80 de la presente invención pueden incluir además otros polipéptidos inmunogénicos de GBS 80 (incluyendo sin limitación polipéptidos y polisacáridos) u otros patógenos.

Otro aspecto de la presente invención proporciona procedimientos de separación o aislamiento de GBS80 de un confórmero particular. Una realización preferida de tales procedimientos incluye proporcionar una muestra que contiene una mezcla de GBS80 en dos o más confórmeros y separar los dos o más confórmeros usando una tecnología de separación seleccionada del grupo que consiste en tecnología de intercambio aniónico, una tecnología de separación basada en hidroxapatita y una tecnología de separación basada en el coeficiente de fricción. Ejemplos de tecnologías de separación basadas en el coeficiente de fricción son electroforesis en gel, cromatografía de exclusión por tamaño, fraccionamiento de campo-flujo y centrifugación por velocidad de sedimentación.

Otro aspecto de la presente invención es anticuerpos que se unen específicamente a o que reconocen cualquier GBS80 de la presente invención. En determinadas realizaciones, tales anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo se puede unir específicamente a un confórmero y no a cualquier otro tal como la unión al confórmero F y no al confórmero A. Se describen realizaciones adicionales de forma más completa a continuación con respecto a anticuerpos, procedimientos de preparar, procedimientos de rastreo y procedimientos de uso de estos anticuerpos.

Como se describe de forma más completa a continuación, los aspectos adicionales de la presente invención incluyen procedimientos de uso de las adhesinas bacterianas anteriores como (a) medicamentos para tratar o evitar la infección debida a bacterias *Streptococcus*; (b) ensayos de diagnóstico o inmunodiagnóstico para detectar la presencia de bacterias *Streptococcus* o de anticuerpos que surgen frente a bacterias *Streptococcus*; y/o (c) reactivos que pueden dar lugar a anticuerpos frente a bacterias *Streptococcus*.

Otro aspecto de la presente divulgación incluye procedimientos de rastreo y/o péptidos de prueba de las adhesinas bacterianas en un confórmero particular para la generación de una respuesta inmunitaria, inmunización activa o inmunización pasiva en un organismo diana. En algunos aspectos, la divulgación implicará poner en contacto o administrar la composición de GBS80 de la presente invención al organismo diana y detectar anticuerpos en el organismo diana que reconozcan la composición de adhesinas bacterianas. En algunos aspectos, el organismo diana se expondrá a bacterias *Streptococcus* para determinar si el organismo diana tiene inmunidad activa o inmunidad pasiva. Estos procedimientos de rastreo se pueden aplicar a cualquiera de las composiciones de la presente invención incluyendo, sin limitación, anticuerpos de GBS80 para GBS80 y composiciones farmacéuticas para inmunogenicidad o antigenicidad. Un aspecto preferido de estos procedimientos de rastreo incluye proporcionar una adhesina bacteriana y rastrear el polipéptido para determinar antigenicidad o inmunogenicidad. Cuando se vaya a rastrear más de una adhesina bacteriana, se puede aplicar un criterio para seleccionar una o más adhesinas bacterianas para su uso posterior. Se puede usar este criterio para seleccionar entre dos o más adhesinas bacterianas, tres o más adhesinas bacterianas, cinco o más adhesinas bacterianas, diez o más adhesinas bacterianas, o veinte o más adhesinas bacterianas.

Otro aspecto de la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen la GBS80 o anticuerpos

de la presente invención en una cantidad terapéuticamente eficaz (o una cantidad inmunológicamente eficaz en una vacuna). En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas serán vacunas. Las vacunas farmacéuticas también pueden tener vehículos farmacéuticamente aceptables incluyendo coadyuvantes.

Descripción detallada de la invención

5 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otro modo, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 19ª edición (1995); Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.); y Handbook of Experimental Immunology, Vol. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, ed., 1986, Blackwell Scientific Publications); Sambrook, y cols., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición, 1989); Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997); Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed. (Ausubel y cols. ed., 1999, John Wiley & Sons); Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory. Course, (Ream y cols., ed., 1998, Academic Press); PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton & Graham ed., 1997, Springer Verlag); Peters y Dalrymple, Fields Virology (2ª ed), Fields y cols. (ed.), B.N. Raven Press, Nueva York, NY.

15 Como se usa en el presente documento, el término "confórmero" se refiere a isoformas aisladas de una adhesina bacteriana, tal como la GBS 80, y fragmentos de las mismas que tienen la misma o similares secuencias de aminoácidos pero diferente inmunogenicidad y/o propiedades biofísicas distinguibles, como se determina, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

20 Como se usa en el presente documento, "adhesinas bacterianas" se refiere a proteínas que pertenecen al grupo de proteínas bacterianas expuestas en superficie que están implicadas en adhesión y colonización de tejido del huésped.

Como se usa en el presente documento, "adhesinas bacterianas gram-positivas" se refiere a adhesinas bacterianas de bacterias gram positivas. Las bacterias gram-positivas son *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *C. difficile*, *L. monocytogenes*, o *C. diphtheriae*.

25 Como se usa en el presente documento, "homólogo de adhesina bacteriana GBS 80" se refiere a la GBS 80 y todas las proteínas relacionadas con GBS 80 por descenso de una secuencia de ADN ancestral común que codifica la proteína ancestral. El término, homólogo, se puede aplicar a la relación entre genes separados por un evento de especiación y a la relación entre genes separados por el evento de duplicación genética. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente homólogos de GBS 80 basándose en la comparación de las secuencias de aminoácidos o de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas. Preferentemente, esa homología será al menos aproximadamente de una identidad del 60%, al menos aproximadamente de una identidad del 70%, al menos aproximadamente de una identidad del 80%, al menos aproximadamente de una identidad del 85%, al menos aproximadamente de una identidad del 90%, al menos aproximadamente de una identidad del 92,5%, al menos aproximadamente de una identidad del 95%, al menos aproximadamente de una identidad del 96%, al menos aproximadamente de una identidad del 97%, al menos aproximadamente de una identidad del 98% o al menos aproximadamente de una identidad del 99%.

40 Como se usa en el presente documento, "ortólogo de adhesina bacteriana GBS 80" se refiere a la GBS 80 y todas las proteínas en otras especies bacterianas que evolucionan a partir de un gen ancestral común por especiación. Estos ortólogos tendrán la misma función retenida en el curso de evolución. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente ortólogos de GBS 80 como el homólogo en otras especies bacterianas que tenga la mayor homología para GBS 80. Preferentemente, esa homología será al menos aproximadamente de una identidad del 60%, al menos aproximadamente de una identidad del 70%, al menos aproximadamente de una identidad del 80%, al menos aproximadamente de una identidad del 85%, al menos aproximadamente de una identidad del 90%, al menos aproximadamente de una identidad del 92,5%, al menos aproximadamente de una identidad del 95%, al menos aproximadamente de una identidad del 96%, al menos aproximadamente de una identidad del 97%, al menos aproximadamente de una identidad del 98% o al menos aproximadamente de una identidad del 99%.

50 Como se usa en el presente documento, "parálogo de adhesina bacteriana GBS 80" se refiere a la GBS 80 y todas las proteínas en las mismas especies bacterianas que evolucionan a partir de un gen ancestral común por duplicación genética. Estos parálogos son genes relacionados por duplicación dentro de un genoma y por lo tanto tendrán papeles muy similares, pero a menudo papeles funcionales distintos. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente parálogos de GBS 80 como el homólogo en otras especies bacterianas que tenga la mayor homología para GBS 80. Preferentemente, esa homología será al menos aproximadamente de una identidad del 60%, al menos aproximadamente de una identidad del 70%, al menos aproximadamente de una identidad del 80%, al menos aproximadamente de una identidad del 85%, al menos aproximadamente de una identidad del 90%, al menos aproximadamente de una identidad del 92,5%, al menos aproximadamente de una identidad del 95%, al menos aproximadamente de una identidad del 96%, al menos aproximadamente de una identidad del 97%, al menos aproximadamente de una identidad del 98% o al menos aproximadamente de una identidad del 99%. A modo de ejemplo, pero sin limitación, GBS 59 es un parálogo de adhesina bacteriana GBS 80.

Las definiciones para homólogo de adhesina bacteriana GBS 80, ortólogo de adhesina bacteriana GBS 80 y parólogo de adhesina bacteriana GBS 80 son definiciones representativas de las adhesinas bacterianas dadas a conocer en el presente documento y GBS 59, GBS 104 y GBS 67 tienen definiciones correspondientes que se pueden usar de manera intercambiable con las definiciones de GBS 80 en toda esta solicitud. A modo de ejemplo, sin limitación, "homólogo de adhesina bacteriana GBS 80" como se usa en el Sumario de la invención, se puede reemplazar por "homólogo de adhesina bacteriana GBS 59".

Adhesinas

Como se discute anteriormente, la invención se refiere a confórmeros de GBS80, procedimientos de separación o aislamiento de los confórmeros y usos de los confórmeros. Las adhesinas son una gran clase heterogénea de proteínas de superficie implicadas en la adhesión y la colonización de tejidos del huésped por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La adherencia a tejidos del huésped es un determinante de virulencia clave para bacterias patógenas y se conocen en la técnica muchos ejemplos de mecanismos de adhesión.

Un aparato de adhesión particularmente eficaz se representa en varios patógenos por fimbrias o pilosidades. Éstos son orgánulos bacterianos adhesivos que permiten a las bacterias dirigir y colonizar tejidos del huésped especiales. Son estructuras de superficie filiformes, largas constituidas por el ensamblaje ordenado de diferentes elementos esenciales, incluyendo adhesinas. La exposición de superficie y el papel clave en la patogénesis de estas proteínas hace que sean una diana particularmente atractiva para composiciones y vacunas inmunogénicas. Se conocen en la técnica muchas de estas vacunas. Las pilosidades, que desde hace tiempo se sabe que es importante para bacterias gram negativas encapsuladas tales como *Neisseria* spp., también se ha descrito en bacterias gram positivas, tales como *Corynebacterium diphtheriae*, *Actinomyces* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus pyogenes*. En estas especies, se forman pilosidades por la reticulación covalente de subunidades de proteínas por la acción de enzimas sortasa que escinden proteínas que contienen el resto de clasificación LPXTG entre los residuos T y G y después, unen la proteína escindida al grupo amino ε de una lisina conservada en un resto de las pilosidades (VYPKN) en los propios componentes de las pilosidades. Las enzimas sortasa también catalizan el acoplamiento covalente de las proteínas de LPXTG a la pared celular de péptidoglucano. Las subunidades de adhesina de esta familia a menudo se encuentran agrupadas en una isla genómica.

GBS 80

GBS 80 es una adhesina bacteriana preferida de la presente invención. GBS 80 se refiere a una proteína de la familia de anclaje a la superficie de la pared celular putativa y es una de las subunidades elementales de una estructura de pilosidad. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de GBS 80 secuenciadas a partir de la cepa aislada de serotipo V 2603 V/R se pueden encontrar en el documento WO04041157. Estas secuencias también se establecen a continuación como las SEC ID N.º 1 y 2:

SEC ID N.º 1

```

ATGAAATTATCGAAGAAGTTATTGTTTTCGGCTGCTGTTTTAACAATGGTGGCGGGTCAACTGTTGAACCAG
TAGCTCAGTTTGCAGCTGGAATGAGTATTGTAAGAGCTGCAGAAGTGTACAAGAACGCCAGCGGAAAACAAC
AGTAAATATCTATAAATTACAAGCTGATAGTTATAAATCGGAAATTACTTCTAATGGTGGTATCGAGAATAAA
GACGGCGAAGTATAATCTAAGTATGCTAAACTTGGTGACAATGTAAAAGGTTTGAAGGTGTACAGTTTAAAC
GTTATAAAGTCAAGACGGATATTTCTGTTGATGAATTGAAAAAATTGACAACAGTTGAAGCAGCAGATGCAAA
AGTTGGAACGATTCTTGAAGAAGGTGTCAGTCTACCTCAAAAACTAATGCTCAAGGTTTGGTTCGTCGATGCT
CTGGATTCAAAAAGTAATGTGAGATACTTGTATGTAGAAGATTTAAAGAATTCACCTTCAAACATTACCAAAG
CTTATGCTGTACCGTTTGTGTTGGAATTACCAGTTGCTAACTCTACAGGTACAGGTTTCCTTTCTGAAATTA
TATTTACCCTAAAAACGTTGTAAGTACTGATGAACCAAAAACAGATAAAGATGTTAAAAAATTAGGTGAGGACGAT
GCAGGTTATACGATTGGTGAAGAATTCAAATGGTCTTGAATCTACAATCCCTGCCAATTTAGGTGACTATG
AAAATTTGAAATTAAGTATAAATTTGCAGATGGCTTGACTTATAAATCTGTTGGAAAAATCAAGATTGGTTC
GAAAACACTGAATAGAGATGAGCACTACACTATTGATGAACCAACAGTTGATAACCAAAATACATTAATAAAT
ACGTTTTAAACCAGAGAAATTTAAAGAAATGCTGAGCTACTTAAAGGAATGACCCCTGTTAAAAATCAAGATG
CTCTTGATAAAGCTACTGCAAAATACAGATGATGCGGCATTTTTGGAAATTCAGTTGCATCAACTATTAATGA
AAAAGCAGTTTTAGGAAAAGCAATTGAAAATACTTTGAACTTCAATATGACCATACTCCTGATAAAGCTGAC
AATCCAAAACCATCTAATCCTCCAAGAAAACAGAAGTTTCATACTGGTGGGAAACGATTTGTAAGAAAAGACT
CAACAGAAACACAAACACTAGGTGGTGTGAGTTGATTTGTTGGCTTCTGATGGGACAGCAGTAAAATGGAC
AGATGCTCTTATTAAGCGAATACTAATAAAAACTATATTGCTGGAGAAGCTGTTACTGGGCAACCAATCAAA
TTGAAATCACATAAGCAGGTACGTTTGAGATTTAAAGGTTTGGCTTATGCAGTTGATGCGAATGCAAGGGTA
CAGCAGTAACTTACAATTTAAAAGAAACAAAAGCACCAGAAGGTTATGTAATCCCTGATAAAGAAATCGAGTT
TACAGTATCAAAAACATCTTATAATACAAAACCAACTGACATCACGGTTGATAGTGTGATGCAACACCTGAT
ACAATTAATAAACAACAAACGTCCTTCAATCCCTAATACTGGTGGTATTGGTACGGCTATCTTTGTGCTATCG
GTGCTGCGGTGATGGCTTTTGTGTTAAGGGGATGAAGCGTCGTACAAAAGATAAC
    
```

SEC ID N.º 2

**MKLSKLLFSAAVLTMVAGSTVEPVAQFATGMSIVRAAEVSQERPAKTTVNIYKLQADSYKSEITSNGGIENK
DGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKLLTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVDDA
LDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLELNVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTDKDVKKLGQDD
AGYTIGEEFKWFLKSTIPANLGDYEKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTLKI
TFKPEKFKEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAAFLEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPKAD
NPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIK
LKSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAPEGYVDPKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPD
TIKNNKRPSIPNTGGIGTAIFVAIGAAMAFVAVKMKRRRTKDN**

Aspectos de la invención pueden incluir fragmentos de GBS80, tales como los descritos en la solicitud provisional de los Estados Unidos N.º 60/812.145. En algunos ejemplos, la retirada de uno o más dominios, tales como una región de la secuencia líder o señal, una región transmembrana, una región citoplásmica o un resto de anclaje a la pared celular, puede facilitar la clonación del gen que codifica el antígeno y/o la expresión recombinante de la proteína de GBS. Además, se pueden usar fragmentos que comprenden epítopos inmunogénicos de antígenos de GBS en las composiciones de la invención.

La GBS 80 contiene una secuencia líder o señal N-terminal que está indicada por la secuencia subrayada al principio de la SEC ID N.º: 2 anterior. En una realización, se retiran uno o más aminoácidos de la región de la secuencia líder o señal de GBS 80. Un ejemplo de un fragmento de GBS 80 de este tipo se establece a continuación como la SEC ID N.º: 3:

SEC ID N.º: 3

**AEVSQERPAKTTVNIYKLQADSYKSEITSNGGIENKDGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDEL
KLLTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVDDALDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLELVA
NSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTDKDVKKLGQDDAGYTIGEEFKWFLKSTIPANLGDYEKFEITDKFADGL
TYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTLKITFKPEKFKEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAA
FLEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPKADNPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFD
LLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIKLSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAP
EGYVDPKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPDTIKNNKRPSIPNTGGIGTAIFVAIGAAMAFVAVKGMK
RRTKDN**

La GBS 80 contiene una región transmembrana C-terminal que está indicada por la secuencia subrayada al principio de la SEC ID N.º: 2 anterior. En una realización, se retiran uno o más aminoácidos de la región transmembrana y/o de una región citoplásmica. Un ejemplo de un fragmento de GBS 80 de este tipo se establece a continuación como la SEC ID N.º: 4:

SEC ID N.º: 4

**MKLSKLLFSAAVLTMVAGSTVEPVAQFATGMSIVRAAEVSQERPAKTTVNIYKLQADSYKSEITSNGGIENK
DGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKLLTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAQGLVDDA
LDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLELNVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTDKDVKKLGQDD
AGYTIGEEFKWFLKSTIPANLGDYEKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQNTLKI
TFKPEKFKEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAAFLEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPKAD
NPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIK
LKSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAPEGYVDPKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPD
TIKNNKRPSIPNTG**

La GBS 80 contiene un resto aminoácido indicativos de un anclaje a la pared celular: SEC ID N.º: 5 "IPNTG" (mostrado en cursiva en la SEC ID N.º: 2 anterior). En algunos sistemas de células huésped recombinantes, es preferible retirar este resto para facilitar la secreción de una proteína GBS 80 recombinante de la célula huésped. En consecuencia, en un fragmento preferido de GBS 80 para su uso en la invención, las regiones transmembrana y/o citoplásmica y el resto de anclaje a la pared celular se retiran de GBS 80. Un ejemplo de un fragmento de GBS 80 de este tipo se establece a continuación como la SEC ID N.º: 6.

SEC ID N.º: 6

MKLSKLLFSAAVLTMVAGSTVEPVAQFATGMSIVRAAEVSRPAKTTVNIYKLQADS YKSEITSNGGIENK
 DGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKKLTTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAOGLVDDA
 LDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLEL PVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTKDKDVKKLGQDD
 AGYTIGEEFKWFLKSTIPANLGDYKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQN TLKI
 TFKPEKFKEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAAFLEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPKAD
 NPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIK
 LKSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAPEGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPD
 TIKNNKRPS

De forma alternativa, en algunos sistemas de células huésped recombinantes, es preferible el uso del resto de anclaje a la pared celular para anclar la proteína expresada de forma recombinante a la pared celular. El dominio extracelular de la proteína expresada se puede escindir durante la purificación o se puede dejar la proteína recombinante unida a cualquiera de las células huésped inactivadas o membranas celulares en la composición final.

En una realización, la región de la secuencia líder o señal, las regiones de transmembrana y citoplásmica y el resto de anclaje a la pared celular se retiran de la secuencia de GBS 80. Un ejemplo de un fragmento de GBS 80 de este tipo se establece a continuación como la SEC ID N.º: 7.

SEC ID N.º: 7

AEVSRPAKTTVNIYKLQADS YKSEITSNGGIENKDGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDEL
 KKLTTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAOGLVDDALD SKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLEL PVA
 NSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTKDKDVKKLGQDDAGYTIGEEFKWFLKSTIPANLGDYKFEITDKFADGL
 TYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQN TLKITFKPEKFKEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAA
 FLEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPKADNPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFD
 LLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIK LKSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAP
 EGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPDTIKNNKRPS

Los solicitantes han identificado un fragmento particularmente inmunogénico de la proteína GBS 80. Este fragmento inmunogénico está situado hacia el extremo N-terminal de la proteína y está subrayado en la secuencia SEC ID N.º: 2 de GBS 80 a continuación. El fragmento subrayado se establece a continuación como la SEC ID N.º: 8.

SEC ID N.º: 2

MKLSKLLFSAAVLTMVAGSTVEPVAQFATGMSIVRAAEVSRPAKTTVNIYKLQADS YKSEITSNGGIENK
DGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDELKKLTTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAOGLVDDA
LDSKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLEL PVANSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTKDKDVKKLGQDD
AGYTIGEEFKWFLKSTIPANLGDYKFEITDKFADGLTYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQN TLKI
TFKPEKFKEIAELLKGMTLVKNQDALDKATANTDDAAFLEIPVASTINEKAVLGKAIENTFELQYDHTPKAD
 NPKPSNPPRKPEVHTGGKRFVKKDSTETQTLGGAEFDLLASDGTAVKWTDALIKANTNKNYIAGEAVTGQPIK
 LKSHTDGTFEIKGLAYAVDANAEGTAVTYKPKETKAP EGYVIPDKEIEFTVSQTSYNTKPTDITVDSADATPD
 TIKNNKRPS

SEC ID N.º: 8

AEVSRPAKTTVNIYKLQADS YKSEITSNGGIENKDGEVISNYAKLGDNVKGLQGVQFKRYKVKTDISVDEL
 KKLTTVEAADAKVGTILEEGVSLPQKTNAOGLVDDALD SKSNVRYLYVEDLKNSPSNITKAYAVPFVLEL PVA
 NSTGTGFLSEINIYPKNVVTDEPKTKDKDVKKLGQDDAGYTIGEEFKWFLKSTIPANLGDYKFEITDKFADGL
 TYKSVGKIKIGSKTLNRDEHYTIDEPTVDNQN TLKITFKPEKFKEIAELLKGM

Confórmero F

Los inventores han descubierto que los antígenos de la familia de adhesina se pueden aislar como dos isoformas principales diferentes: (a) confórmero F y (b) confórmero A. Estas isoformas, aunque comparten las mismas o similares secuencias de aminoácidos, se pueden separar de acuerdo con sus propiedades biofísicas diferenciadas usando etapas de purificación de proteínas, tales como separación cromatográfica. Por ejemplo, en la cromatografía por intercambio iónico, el confórmero A se caracteriza porque se absorbe a Q-sefarosa mientras que el confórmero F se eluye. También se puede llevar a cabo un procedimiento para el aislamiento y la purificación del confórmero F por cromatografía con hidroxipatita como se describe, por ejemplo, en el ejemplo 1. Las dos isoformas se desplazan con diferentes PM aparentes durante la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio sin desnaturalización (SDS-PAGE), mientras que muestran los mismos PM aparentes una vez que se han desnaturalizado por calor. Cuando se desplazan en una columna de cromatografía de exclusión por tamaño, se

requieren mayores volúmenes de elución para el confórmero F en comparación con el confórmero A. Además, las dos isoformas muestran estabilidad e inmunogenicidad diferentes, siendo el confórmero F la forma más estable e inmunogénica. De hecho, con el tiempo, un lote purificado de un confórmero A presentará isoformas adicionales, incluyendo el confórmero F. La inmunización con un confórmero F purificado da una respuesta inmunitaria mejorada cuando se compara con una inmunización con el confórmero A o una mezcla de isoformas en la que el confórmero F sólo es una subfracción. El confórmero F también muestra un incremento en la resistencia a la digestión por proteasas.

En algunas realizaciones, los confórmeros tienen la secuencia de aminoácidos de una GBS80 de longitud completa. En otras realizaciones, estos confórmeros tienen la secuencia de aminoácidos de fragmentos de GBS80 que se pueden encontrar en el confórmero F. Estos fragmentos se pueden identificar fácilmente usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en el presente documento.

Por ejemplo, los inventores han descubierto que el fragmento recombinante de GBS 80 establecido como la SEC ID N.º: 7 de hecho se puede purificar como uno de los dos confórmeros descritos anteriormente y han mostrado que el confórmero F tiene una inmunogenicidad mejorada sobre el confórmero A. La espectrometría de masas (EM) MALDI y la secuenciación del extremo amino terminal confirmaron que la secuencia de aminoácidos de las dos isoformas coincide. En una SDS-PAGE sin desnaturalización, el confórmero F muestra un peso molecular menor en comparación con el confórmero A pero, cuando se hierven las muestras, las dos isoformas se desplazan con el mismo PM aparente. En consecuencia, se observa una anomalía similar cuando se aplica la preparación de proteínas a una columna de filtración en gel, en la que el confórmero F se eluye como un pico monodisperso a un volumen de elución mayor. Este comportamiento es consistente con el menor peso molecular aparente observado en la SDS-PAGE sin desnaturalización. Como se explica con más detalle a continuación, las pruebas de estabilidad indican además que una preparación de GBS 80 recuperada de la fracción absorbida en Q-sefarosa se eluye de una columna de filtración por gel como un pico polidisperso con el tiempo, indicando que se generan isoformas adicionales. El pico adicional con el volumen de elución menor corresponde al confórmero F.

Con el tiempo, cualquier confórmero A residual se puede convertir a confórmero F. Preferentemente, cuando las composiciones inmunogénicas de la invención se van a administrar a un mamífero, la composición está sustancialmente libre de confórmero A.

Sistemas de expresión

El confórmero F de la adhesina bacteriana se puede producir de forma recombinante por medio de muchos sistemas de expresión diferentes; por ejemplo los usados con células de mamíferos, baculovirus, plantas, bacterias y levaduras.

i. Sistemas de mamíferos

En la técnica se conocen sistemas de expresión de mamíferos. Un promotor de mamífero es cualquier secuencia de ADN que se puede unir a la ARN polimerasa de mamífero e iniciar la transcripción corriente abajo 3' (3') de una secuencia de codificación (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción, que se sitúa normalmente próxima al extremo 5' de la secuencia de codificación, y una secuencia TATA, localizada normalmente 25-30 pares de bases (pb) corriente arriba 5' del sitio de inicio de la transcripción. Se cree que la secuencia TATA dirige la ARN polimerasa II para iniciar la síntesis de ARN en el sitio correcto. Un promotor de mamífero también contendrá un elemento promotor corriente arriba 5', localizado normalmente dentro de las de 100 a 200 pb corriente arriba 5' de la secuencia TATA. Un elemento promotor corriente arriba 5' determina la velocidad a la que se inicia la transcripción y puede actuar en cualquier orientación (Sambrook y cols. (1989) *Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells*. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed.).

Los genes víricos de mamíferos a menudo están altamente expresados y tienen una amplia gama de huéspedes, por lo tanto, las secuencias que codifican genes víricos de mamíferos proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen el promotor temprano de SV40, el promotor LTR del virus del tumor mamario de ratón, el promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP) y el promotor del virus del herpes simple. Además, las secuencias derivadas de genes no víricos, tales como el gen de metalotioneína murino, también proporcionan secuencias promotoras útiles. La expresión puede ser constitutiva o bien regulada (inducible), dependiendo de si se puede inducir el promotor con glucocorticoide en células sensibles a hormonas.

La presencia de un elemento potenciador (potenciador), combinado con los elementos promotores descritos anteriormente, incrementará normalmente los niveles de expresión. Un potenciador es una secuencia de ADN reguladora que puede estimular la transcripción hasta 1000 veces cuando se une a promotores homólogos o heterólogos, iniciando la síntesis en el sitio de inicio normal del ARN. Los potenciadores también son activos cuando se sitúan corriente arriba 5' o corriente arriba 3' del sitio de inicio de la transcripción, en orientación normal o bien girada, o a una distancia de más de 1000 nucleótidos del promotor (Maniatis y cols. (1987) *Science* 236:1237; Alberts y cols. (1989) *Molecular Biology of the Cell*, 2ª ed.). Los elementos potenciadores derivados de virus pueden ser particularmente útiles, debido a que normalmente tienen una gama más amplia de huéspedes. Los ejemplos incluyen el potenciador del gen temprano de SV40 (Dijkema y cols. (1985) *EMBO J.* 4:7611) y los potenciadores/promotores derivados de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Gorman y cols. (1982b) *Proc. Natl.*

Acad. Sci. 79:6777) y del citomegalovirus humano (Boshart y cols. (1985) Cell 41:5211). Adicionalmente, algunos potenciadores son regulables y se vuelven activos sólo en presencia de un inductor, tal como una hormona o un ión metálico (Sassone-Corsi y Borelli (1986) Trends Genet. 2:215; Maniatis y cols. (1987) Science 236:1237).

5 Una molécula de ADN se puede expresar intracelularmente en células de mamíferos. Se puede unir directamente una secuencia promotora con la molécula de ADN, caso en el que el primer aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína recombinante será siempre una metionina, que está codificada por el codón de inicio ATG. Si se desea, se puede escindir el extremo N-terminal de la proteína por incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.

10 De forma alternativa, también se pueden secretar proteínas extrañas a partir de la célula en el medio de crecimiento creando moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de la secuencia líder que proporciona la secreción de la proteína extraña en las células de mamíferos. Preferentemente, existen sitios de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen extraño que se pueden escindir *in vivo* o bien *in vitro*. El fragmento de la secuencia líder normalmente codifica un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína a partir de la célula. El líder tripartito de adenovirus es un ejemplo de una secuencia líder que proporciona la secreción de una proteína extraña en células de mamíferos.

15 Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción y de poliadenilación reconocidas por las células de mamíferos son regiones reguladoras localizadas corriente abajo 3' con respecto al codón de detención de la traducción y por tanto, junto con los elementos promotores, flanquean la secuencia de codificación. El extremo terminal corriente arriba 3' de ARNm maduro está formado por la escisión post-traducciona específica de sitio y la poliadenilación (Bimstiel y cols. (1985) Cell 41:349; Proudfoot y Whitelaw (1988) Termination and 3' end processing of eukaryotic RNA. En: Transcription and splicing (ed. B.D. Hames y D.M. Glover); Proudfoot (1989) Trends Biochem. Sci. 14:1051). Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que se puede traducir en el polipéptido codificado por el ADN. Los ejemplos de señales del finalizador de la transcripción/poliadenilación incluyen las derivadas de SV40 (Sambrook y cols. (1989) Expression of cloned genes in cultured mammalian cells. En Molecular Cloning: A Laboratory Manual).

25 Normalmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción se introducen juntas en construcciones de expresión. También se pueden incluir potenciadores, intrones con sitios donante y aceptor de corte y empalme, y secuencias líder en una construcción de expresión, si se desea. A menudo, las construcciones de expresión se mantienen en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz de mantenimiento estable en un huésped, tal como células de mamíferos o bacterias. Los sistemas de replicación en mamíferos incluyen los derivados de virus animales, que requieren factores que actúan en trans para replicarse. Por ejemplo, los plásmidos que contienen sistemas de replicación de papovavirus, tales como SV40 (Gluzman (1981) Cell 23:1751) o poliomavirus, se replican en un número extremadamente elevado de copias en presencia del antígeno T vírico apropiado. Los ejemplos adicionales de replicones de mamíferos incluyen los derivados de papilomavirus bovinos y virus de Epstein-Barr. Adicionalmente, el replicón puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo así que se mantenga, por ejemplo, en células de mamíferos para la expresión y en un huésped procariota para la clonación y la amplificación. Los ejemplos de dichos vectores transportadores de bacterias de mamíferos incluyen pMT2 (Kaufman y cols. (1989) Mol. Cell. Biol. 9:946) y pHEBO (Shimizu y cols. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:10741). El procedimiento de transformación usado depende del huésped que se va a transformar. En la técnica se conocen procedimientos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos, e incluyen la transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del/de los polinucleótido(s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en núcleos.

40 En la técnica se conocen líneas de células de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión, e incluyen muchas líneas de células inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC), que incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y otras muchas líneas celulares.

ii. Sistemas de baculovirus

50 También se puede insertar un polinucleótido que codifica el cófrmero F en un vector de expresión de insecto adecuado unido de forma operable a los elementos de control en el interior de ese vector. La construcción del vector emplea técnicas que se conocen en la técnica. En general, los componentes del sistema de expresión incluyen un vector de transferencia, normalmente un plásmido bacteriano, que contiene tanto un fragmento del genoma de baculovirus como un sitio de restricción conveniente para la inserción del gen o los genes heterólogos que se van a expresar, un baculovirus natural con una secuencia homóloga a la del fragmento específico de baculovirus en el vector de transferencia (esto permite la recombinación homóloga del gen heterólogo en el genoma del baculovirus); y células huéspedes de insectos apropiadas y medios de crecimiento. Tras insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el vector de transferencia, el vector y el genoma vírico natural se transfectan en una célula huésped de insecto, en la que se permite que el vector y el genoma vírico se recombinen. El virus recombinante empaquetado se expresa y se identifican y se purifican las placas recombinantes. Los materiales y los procedimientos para los sistemas de expresión de baculovirus/célula de insecto están comercialmente disponibles en forma de kit de, entre otros, Invitrogen, San

Diego CA (kit "MaxBac"). Los expertos en la técnica conocen generalmente estas técnicas y se describen completamente en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station, Boletín nº 1555 (1987) (a continuación en el presente documento "Summers y Smith").

5 Antes de insertar la secuencia de ADN que codifica la proteína en el genoma del baculovirus, los componentes descritos anteriormente, que comprende un promotor, una secuencia de codificación de interés, líder (si se desea), y una secuencia de terminación de la transcripción, normalmente se ensamblan en una construcción intermedia situada en trans (vector de transferencia). Esta construcción puede contener un gen único y elementos reguladores unidos de forma operable; múltiples genes, cada uno con su propio conjunto de elementos reguladores unidos de forma operable, o múltiples genes, regulados por el mismo conjunto de elementos reguladores. Las construcciones intermedias situadas en trans a menudo se mantienen en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz de mantenimiento estable en un huésped, tal como una bacteria. El replicón tendrá un sistema de replicación, permitiendo así que se mantenga en un huésped adecuado para la clonación y la amplificación.

15 Actualmente, el vector de transferencia usado más comúnmente para introducir genes extraños en AcNPV es pAc373. También se han diseñado muchos otros vectores, conocidos por los expertos en la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, pVL985 (que altera el codón de inicio de la polihedrina de ATG a ATT, y que introduce un sitio de clonación BamHI 32 pares de bases corriente arriba 3' a partir de ATT; (Luckow y Summers, Virology (1989) 17:31).

El plásmido también contiene la señal de poliadenilación de la polihedrina (Miller y cols. (1988) Ann. Rev. Microbiol., 42:177) y un gen procariota de resistencia a la ampicilina (amp) y el origen de la replicación para la selección y la propagación en *E. coli*.

20 Normalmente, los vectores de transferencia de baculovirus contienen un promotor de baculovirus. Un promotor de baculovirus es cualquier secuencia de ADN que se puede unir a una ARN polimerasa de baculovirus e iniciar la transcripción corriente arriba 3' (5' a 3') de una secuencia de codificación (por ejemplo, gen estructural) en el ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que normalmente se sitúa próxima al extremo 5' de la secuencia de codificación. Normalmente, esta región de inicio de la transcripción incluye un sitio de unión a la ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un vector de transferencia de baculovirus también puede tener un segundo dominio denominado potenciador, que, si está presente, normalmente es distal al gen estructural. La expresión puede ser regulada o bien constitutiva.

30 Los genes estructurales, transcritos abundantemente en tiempos tardíos en un ciclo de infección vírica, proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias derivadas del gen que codifica la proteína vírica de la polihedrina (Friesen y cols., (1986) The regulation of Baculovirus Gene Expresión, en: The Molecular Biology of Baculoviruses (ed. Walter Doerfler); Publ. EPO N.º 127 839 y 155 476) y el gen que codifica la proteína p10 (Vlak y cols., (1988), J. Gen. Virol. 69. 765).

35 Se puede derivar el ADN que codifica las secuencias señal adecuadas a partir de los genes de las proteínas secretadas por insectos o baculovirus, tales como el gen de la polihedrina de baculovirus (Carbonell y cols. (1988) Gene, 73:409). De forma alternativa, ya que las señales para las modificaciones postraduccionales de las células de mamíferos (tales como la escisión del péptido señal, escisión proteolítica y fosforilación) parece que se reconocen por las células de insectos, y las señales requeridas para la secreción y la acumulación nuclear también parece que se conserva entre las células de invertebrados y las células de vertebrados, también se pueden usar líderes de origen no de insecto, tales como los derivados de los genes que codifican el interferón α humano, (Maeda y cols., (1985), Nature 315:592); péptido que libera la gastrina humana (Lebacqz-Verheyden y cols., (1988), Molec. Cell. Biol. 8:3129); IL-2 humana (Smith y cols., (1985) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 82:8404); IL-3 de ratón (Miyajima y cols., (1987) Gene 58:273); y glucocerebrosidasa humana (Martin y cols. (1988) DNA, 7:99), para proporcionar la secreción en insectos.

45 Se puede expresar intracelularmente un polipéptido o poliproteína recombinante o se puede secretar, si se expresa con las secuencias reguladoras apropiadas. Una buena expresión intracelular de las proteínas extrañas no condensadas normalmente requiere genes heterólogos que tengan de forma ideal una secuencia líder corta que contenga las señales de inicio de la traducción adecuadas que preceden a una señal de inicio de ATG. Si se desea, se puede escindir la metionina en el extremo N-terminal de la proteína madura por incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.

50 De forma alternativa, se pueden secretar poliproteínas o proteínas recombinantes que no se secretan de forma natural de la célula de insecto creando moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia líder que proporciona la secreción de la proteína extraña en insectos. El fragmento de la secuencia líder codifica normalmente un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la translocación de la proteína en el retículo endoplásmico.

55 Después de la inserción de la secuencia de ADN y/o del gen que codifica el precursor del producto de expresión de la proteína, se cotransforma una célula huésped de insecto con el ADN heterólogo del vector de transferencia y el ADN genómico del baculovirus natural (normalmente por cotransfección). Normalmente, el promotor y la secuencia de terminación de la transcripción de la construcción comprenderán una sección de 2-5 kb del genoma del baculovirus. En

la técnica s conocen procedimientos para introducir ADN heterólogo en el sitio deseado en el virus baculovirus (véase Summers y Smith *supra*; Ju y cols. (1987); Smith y cols., Mol. Cell. Biol. (1983) 3:2156; y Luckow y Summers (1989)). Por ejemplo, la inserción puede estar en un gen tal como el gen de polihedrina, por recombinación por doble entrecruzamiento homóloga; la inserción también puede estar en un sitio de enzima de restricción manipulada en el gen de baculovirus deseado. Miller y col., (1989), Bioessays 4:91). La secuencia de ADN, cuando se clona en lugar del gen de polihedrina en el vector de expresión, está flanqueada tanto en 5' como en 3' por secuencias específicas de polihedrina y está situada corriente abajo 3' del promotor de polihedrina.

El vector de expresión de baculovirus recién formado se empaqueta posteriormente en un baculovirus recombinante infeccioso. La recombinación homóloga se produce a baja frecuencia (entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 5%); por tanto, la mayoría del virus producido después de la cotransfección todavía es un virus natural. Por lo tanto, es necesario un procedimiento para identificar virus recombinantes. Una ventaja del sistema de expresión es una selección visual que permite distinguir virus recombinantes. La proteína polihedrina, que se produce por el virus nativo, se produce a niveles muy altos en los núcleos de las células infectadas en las etapas tardías después de la infección vírica. La proteína polihedrina acumulada forma cuerpos de oclusión que también contienen partículas embebidas. Estos cuerpos de oclusión, de hasta 15 µm en tamaño, son altamente refractivo, lo que les proporciona una apariencia brillante que se visualiza fácilmente en el microscopio óptico. Las células infectadas con virus recombinantes carecen de cuerpos de oclusión. Para distinguir virus recombinante de virus natural, se plaquea el sobrenadante de transfección en una monocapa de células de insecto por técnicas conocidas por los expertos en la técnica. En concreto, se rastrean las placas en el microscopio óptico para detectar la presencia (indicativa de virus natural) o la ausencia (indicativa de virus recombinante) de cuerpos de oclusión (Current Protocols in Microbiology, Vol. 2 (Ausubel y cols. eds) en 16.8 (Sup. 10, 1990); Summers y Smith, *supra*; Miller y cols. (1989)).

Se han desarrollado vectores de expresión de baculovirus recombinantes para la infección de varias células de insecto. Por ejemplo, se han desarrollado baculovirus recombinantes para, entre otros: *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni* (documento WO 89/046699; Carbonell y cols., (1985) J. Virol. 56:153; Wright (1986) Nature 321:718; Smith y cols., (1983) Mol. Cell. Biol. 3:2156; y véase en general, Fraser, y cols. (1989) *In vitro* Cell. Dev. Biol. 25:225).

Las células y los medios de cultivo celular están disponibles comercialmente tanto para la expresión directa como de fusión de polipéptidos heterólogos en un baculovirus/sistema de expresión; en general, los expertos en la técnica conocen la tecnología de cultivo celular. Véase, por ejemplo, Summers y Smith *supra*.

Las células de insecto modificadas se pueden cultivar después en un medio nutriente apropiado, lo que permite el mantenimiento estable del/de los plásmido(s) presente(s) en el huésped insecto modificado. Cuando el gen producido por la expresión está bajo un control inducible, se puede cultivar el huésped hasta alta densidad y se puede inducir la expresión. Como alternativa, cuando la expresión es constitutiva, el producto se expresará de forma continua en el medio y el medio nutriente debe circular de forma continua, mientras se retira el producto de interés y se aumentan los nutrientes agotados. Se puede purificar el producto por técnicas tales como cromatografía, por ejemplo, HPLC, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, etc.; electroforesis; centrifugación por gradiente de densidad; extracción del disolvente, o similares. Según sea apropiado, se puede purificar adicionalmente el producto, según se requiera, para retirar sustancialmente cualquier proteína de insecto que también se secrete en el medio o que sea resultado de la lisis de células de insectos, para proporcionar un producto que esté al menos sustancialmente libre de restos del huésped, por ejemplo, proteínas, lípidos y polisacáridos.

Para obtener la expresión de las proteínas, se incuban las células huésped recombinantes derivadas de los transformantes en condiciones que permitan la expresión de la secuencia que codifica la proteína recombinante. Estas condiciones variarán, dependiendo de la célula huésped seleccionada. Sin embargo, las condiciones son fácilmente determinables por los expertos en la técnica, en base a lo que se conoce en la técnica.

45 **iii. Sistemas de plantas**

Hay muchos sistemas de expresión genética de cultivo de células vegetales y de plantas completas conocidos en la técnica. Los sistemas de expresión genética en células vegetales ejemplares incluyen los descritos en patentes, tales como: US 5.693.506; US 5.659.122; y US 5.608.143. Se han descrito otros ejemplos de expresión genética en cultivo de células vegetales por Zenk, Phytochemistry 30: 3861-3863 (1991). Pueden encontrarse descripciones de péptidos señal de proteínas vegetales además de las referencias descritas anteriormente en Vaulcombe y cols., Mol. Gen. Genet. 209:33-40 (1987); Chandler y cols., Plant Molecular Biology 3: 407-418 (1984); Rogers, J. Biol. Chem. 260:3731-3738 (1985); Rothstein y cols., Gene 55:353-356 (1987); Whittier y cols., Nucleic Acids Research 15:2515-2535 (1987); Wirsel y cols., Molecular Microbiology 3:3-14 (1989); y Yu y cols., Gene 122:247-253 (1992). Una descripción de la regulación de expresión de genes vegetales por la fitohormona, el ácido giberélico y las enzimas secretadas inducidas por el ácido giberélico se puede encontrar en R.L. Jones y J. MacMillin, Gibberellins: en: Advanced Plant Physiology, Malcolm B. Wilkins, ed., 1984 Pitman Publishing Limited, London, p. 21-52. Referencias que describen otros genes regulados metabólicamente: Sheen, Plant Cell, 2:1027-1038 (1990); Maas y cols., EMBO J. 9: 3447-3452 (1990); Benkel y Hickey, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:1337-1339(1987)

Normalmente, usando técnicas conocidas en la técnica, se inserta una secuencia de polinucleótidos deseada dentro de un casete de expresión que comprende elementos reguladores genéticos diseñados para el funcionamiento en plantas. La casete de expresión se inserta en un vector de expresión deseado con secuencias acompañantes corriente abajo 5' y 3' del casete de expresión adecuado para la expresión en un huésped vegetal. Las secuencias acompañantes serán de origen vírico o plasmídico y proporcionan las características necesarias al vector para permitir que los vectores muevan ADN de un huésped de clonación original, tal como una bacteria, al huésped vegetal deseado. La construcción básica bacteria/vector de planta proporcionará preferentemente un origen de replicación procarionta de amplia variedad de huéspedes; un marcador seleccionable procarionta; y, para transformaciones de *Agrobacterium*, secuencias de ADN T para la transferencia mediada por *Agrobacterium* a cromosomas vegetales. Cuando el gen heterólogo no es fácilmente susceptible de detección, la construcción también tendrá preferentemente un gen marcador seleccionable adecuado para determinar si una célula vegetal se ha transformado. Una revisión general de los marcadores adecuados, por ejemplo para los miembros de la familia de las gramíneas, se encuentra en Wilmink y Dons, 1993, *Plant Mol. Biol. Repr.*, 11 (2):165-185.

También se recomiendan las secuencias adecuadas para permitir la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la planta. Éstas pueden incluir secuencias de transposón y similares para recombinación homóloga así como secuencias Ti que permiten la inserción aleatoria de un casete de expresión heterólogo en un genoma vegetal. Los marcadores seleccionables procariontas adecuados incluyen resistencia a antibióticos tales como ampicilina o tetraciclina. También pueden estar presentes en el vector otras secuencias de ADN que codifican funciones adicionales, como se conoce en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican el objeto de la invención se pueden incluir en un casete de expresión para la expresión de la(s) proteína(s) de interés. Normalmente, sólo habrá un casete de expresión, aunque sean factibles dos o más. El casete de expresión recombinante contendrá además de la secuencia que codifica la proteína heteróloga los siguientes elementos: una región promotora, secuencias sin traducir en 5' vegetales, codón de iniciación dependiendo de si el gen estructural está o no equipado con uno, y una secuencia de terminación de la transcripción y de la traducción. Los sitios de enzima de restricción únicos en los extremos 5' y 3' del casete permiten la fácil inserción en un vector preexistente.

Una secuencia de codificación heteróloga puede ser para cualquier proteína relacionada con la presente invención. La secuencia que codifica la proteína de interés codificará un péptido señal que permita el procesamiento y la translocación de la proteína, según sea apropiado, y normalmente carecerá de cualquier secuencia que pueda dar como resultado la unión de la proteína deseada de la invención a una membrana. Aunque, en su mayoría, la región de iniciación de la transcripción será la de un gen que se expresa y se transloca durante la germinación, empleando el péptido señal que proporciona la translocación, también puede proporcionarse la translocación de la proteína de interés. De este modo, la(s) proteína(s) de interés se translocará(n) a partir de las células en las que se expresan y se pueden recoger de forma eficaz. Normalmente, la secreción en las semillas es a través de la aleurona o de la capa de epitelio del escutelo en el endospermo de la semilla. Aunque no se requiere que la proteína se secrete desde las células en las que se produce la proteína, esto facilita el aislamiento y la purificación de la proteína recombinante.

Dado que la expresión definitiva del producto génico deseado estará en una célula eucariota, es deseable determinar si cualquier porción del gen clonado contiene secuencias que se procesarán como intrones por la maquinaria de corte y empalme del huésped. Si es así, se puede llevar a cabo la mutagénesis dirigida a sitio de la región "intrón" para evitar la pérdida de una porción del mensaje genético como falso código intrón (Reed and Maniatis, *Cell* 41:95-105, 1985).

El vector se puede microinyectar directamente en células vegetales por el uso de micropipetas para transferir mecánicamente el ADN recombinante (Crossway, *Mol. Gen. Genet.*, 202:179-185, 1985). El material genético también se puede transferir en la célula vegetal usando polietilenglicol (Krens, y cols., *Nature*, 296, 72-74, 1982). Otro procedimiento de introducción de segmentos de ácido nucleico es la penetración balística a alta velocidad por pequeñas partículas con el ácido nucleico dentro de la matriz de pequeñas perlas o partículas, o sobre la superficie (Klein, y cols., *Nature*, 327, 70-73, 1987 y Knudsen y Muller, 1991, *Planta*, 185:330-336) que muestran el bombardeo de partículas del endospermo de cebada para crear cebada transgénica. Otro procedimiento de introducción sería la fusión de protoplastos con otras entidades, minicélulas, células, lisosomas o bien otros cuerpos con superficie lipídica condensables, Fraley, y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1859-1863, 1982.

El vector también se puede introducir dentro de las células vegetales por electroporación (Fromm y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5824, 1985). En esta técnica, los protoplastos vegetales se someten a electroporación en presencia de plásmidos que contienen la construcción génica. Los impulsos eléctricos de alta intensidad de campo permeabilizan de forma reversible las membranas permitiendo la introducción de los plásmidos. Los protoplastos vegetales electroporados vuelven a formar la pared celular, se dividen y forman callos vegetales.

Todas las plantas a partir de las que se pueden aislar y cultivar protoplastos para dar plantas regeneradas completas se pueden transformar por la presente invención de modo que se recuperen plantas completas que contienen el gen transferido. Se sabe que prácticamente todas las plantas se pueden regenerar a partir de células o tejidos cultivados, incluyendo pero sin limitarse a todas las especies principales de caña de azúcar, remolacha azucarera, algodón, fruta y otros árboles, legumbres y verduras. Algunas plantas adecuadas incluyen, por ejemplo, especies de los géneros

Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersion, Nicotiana, Solanum, Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Hererocallis, Nemesia, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browaalia, Glycine, Lolium, Zea, Triticum, Sorghum y Datura.

Los medios de regeneración varían de especie a especie vegetal, pero en general en primer lugar se proporciona una suspensión de protoplastos transformados que contienen copias del gen heterólogo. Se forma tejido caloso y se pueden inducir brotes a partir de los callos y posteriormente pueden echar raíces. De forma alternativa, se puede inducir la formación de embriones de la suspensión de protoplastos. Estos embriones germinan como embriones naturales para formar plantas. En general, el medio de cultivo contendrá diferentes aminoácidos y hormonas, tales como auxina y citocininas. También es ventajoso añadir ácido glutámico y prolina al medio, especialmente para especies tales como maíz y alfalfa. Normalmente, los brotes y las raíces se desarrollan de forma simultánea. La regeneración eficaz dependerá del medio, del genotipo y del historial del cultivo. Si se controlan estas tres variables, entonces la regeneración es totalmente reproducible y repetible.

En algunos sistemas de cultivo de células vegetales, la proteína deseada de la invención se puede excretar o, como alternativa, la proteína se puede extraer a partir de la planta completa. Cuando la proteína deseada de la invención se secreta al medio, ésta se puede recoger. Como alternativa, los embriones y las semillas sin embrión u otro tejido vegetal se pueden romper mecánicamente para liberar cualquier proteína secretada entre las células y los tejidos. Se puede suspender la mezcla en una disolución tampón para recuperar las proteínas solubles. Después, se utilizarán procedimientos convencionales de aislamiento y purificación de proteínas para purificar la proteína recombinante. Se ajustarán los parámetros de tiempo, temperatura, pH, oxígeno y volumen mediante procedimientos rutinarios para optimizar la expresión y la recuperación de la proteína heteróloga.

iv. Sistemas bacterianos

En la técnica se conocen técnicas de expresión bacteriana. Un promotor bacteriano es cualquier secuencia de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción corriente abajo 3' (3') de una secuencia de codificación (por ejemplo, un gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de iniciación de la transcripción que se sitúa normalmente en próxima al extremo 5' de la secuencia de codificación. Normalmente, esta región de inicio de la transcripción incluye un sitio de unión a la ARN polimerasa y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor bacteriano también puede tener un segundo dominio llamado un operador, que puede solaparse con un sitio de unión de ARN polimerasa adyacente en el que se inicia la síntesis de ARN. El operador permite la transcripción regulada negativa (inducible), ya que una proteína represora del gen se puede unir al operador y de este modo inhibir la transcripción de un gen específico. La expresión constitutiva se puede producir en ausencia de elementos reguladores negativos, tales como el operador. Además, se puede lograr la regulación positiva mediante una secuencia de unión a la proteína activadora del gen, que, si está presente, normalmente está próxima (5') a la secuencia de unión a la ARN polimerasa. Un ejemplo de una proteína activadora del gen es la proteína activadora de catabolitos (CAP), que ayuda a iniciar la transcripción del operón lac en *Escherichia coli* (Raibaud y cols., (1984) *Annu. Rev. Genet.* 18:173). Por lo tanto, la expresión regulada puede ser positiva o bien negativa, potenciando o bien reduciendo de este modo la transcripción.

Las secuencias que codifican enzimas de vías metabólicas proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas que metabolizan azúcares, tales como galactosa, lactosa (lac) (Chang y cols. (1977) *Nature* 198:1056), y maltosa. Otros ejemplos incluyen secuencias promotoras derivadas de enzimas biosintéticas, tales como triptófano (trp) (Goeddel y cols. (1980) *Nuc. Acids Res.* 8:4057; Yelverton y cols. (1981) *Nucl. Acids Res.* 9:731; patente de los Estados Unidos 4.738.921; documentos EP-A-0036776 y EP-A-0121775); y el sistema promotor de p-lactamasa (bla) (Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." En *Interferon 3* (ed. 1. Gresser)). El bacteriófago lambda PL (Shimatake y cols. (1981) *Nature* 292:128) y sistemas promotores T5 (patente de los Estados Unidos 4.689.406) también proporcionan secuencias promotoras útiles.

Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también funcionan como promotores bacterianos. Por ejemplo, las secuencias de activación de la transcripción de un promotor bacteriano o promotor de bacteriófago se pueden unir con las secuencias de operón de otro promotor bacteriano o promotor de bacteriófago, creando un promotor híbrido sintético (patente de los Estados Unidos 4.551.4331). Por ejemplo, el promotor tac es un promotor trp-lac híbrido que comprende las secuencias tanto del promotor trp como del operón lac que está regulado por el represor lac (Amann y cols. (1983) *Gene* 25:167; de Boer y cols. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:21). Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores de origen natural y no bacteriano que tengan la capacidad de unirse a ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Un promotor de origen natural y no bacteriano también se puede acoplar con una ARN polimerasa compatible para producir altos niveles de expresión de algunos genes en procariontes. El sistema de ARN polimerasa/promotor del bacteriófago T7 es un ejemplo de un sistema promotor acoplado (Studier y cols. (1986) *J. Mol. Biol.* 189:113; Tabor y cols. (1985) *Proc Natl. Acad. Sci.* 82:1074). Además, un promotor híbrido también puede comprender un promotor bacteriófago y una región operadora de *E. coli* (documento EPO-A-0 267 851).

- Además de la secuencia promotora en funcionamiento, también es útil un sitio de unión al ribosoma eficaz para la expresión de genes extraños en procariontes. En *E. coli*, el sitio de unión al ribosoma se denomina la secuencia Shine-Dalgarno (SD) e incluye un codón de iniciación (ATG) y una secuencia de 3-9 nucleótidos de longitud situada 3-11 nucleótidos corriente abajo 5' del codón de iniciación (Brillo y cols. (1975) *Nature* 254:34). Se cree que la
- 5 la secuencia SD promueve la unión de ARNm al ribosoma emparejando bases entre la secuencia SD y el extremo 3' del ARNr 16S de *E. coli* (Steitz y cols. (1979) "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA." En *Biological Regulation and Development: Gene Expression* (ed. R.F. Goldberger)). Para expresar genes eucariotas y genes procariontes con un sitio de unión débil al ribosoma (Sambrook y cols. (1989) "Expression of cloned genes in *Escherichia coli*." En *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*).
- 10 Una molécula de ADN se puede expresar intracelularmente. Se puede unir directamente una secuencia promotora con la molécula de ADN, caso en el que el primer aminoácido en el extremo N-terminal será siempre una metionina, que está codificada por el codón de inicio ATG. Si se desea, la metionina en el extremo N-terminal se puede escindir de la proteína por incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno o por incubación *in vivo* o *in vitro* con una peptidasa N-terminal de metionina bacteriana (documento EPO-A-0 219 237).
- 15 Las proteínas de fusión proporcionan una alternativa a la expresión directa. Normalmente, una secuencia de ADN que codifica la porción N-terminal de una proteína bacteriana endógena, u otra proteína estable, se fusiona al extremo 5' de secuencias de codificación heterólogas. Después de la expresión, esta construcción proporcionará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen de la célula del bacteriófago lambda se puede unir en el extremo 5' terminal de un gen extraño y se puede expresar en bacterias. La proteína de fusión resultante conserva
- 20 preferentemente un sitio para una enzima de procesamiento (factor Xa) para escindir la proteína del bacteriófago del gen extraño (Nagai y cols. (1984) *Nature* 309:8101). Las proteínas de fusión también se puede preparar con secuencias de los genes lacZ (Jia y cols. (1987) *Gene* 60:197), trpE (Allen y cols. (1987) *J. Biotechnol.* 5:93; Makoff y cols. (1989) *J. Gen. Microbiol.* 135:11), y Chey (documento EP-A-0 324 647). La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácidos puede o no codificar un sitio escindible. Otro ejemplo es una proteína de fusión de
- 25 ubiquitina. Una proteína de fusión de este tipo se prepara con la región de ubiquitina que conserva preferentemente un sitio para una enzima de procesamiento (por ejemplo, una proteasa de procesamiento específica de ubiquitina) para escindir la ubiquitina de la proteína extraña. A través de este procedimiento, se puede aislar una proteína extraña natural (Miller y cols. (1989) *Biotechnology* 7:698).
- De forma alternativa, las proteínas extrañas también se pueden secretar de la célula creando moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia de péptido señal que proporciona la secreción de la proteína extraña en bacterias (patente de los Estados Unidos 4.336.336). El fragmento de la secuencia señal normalmente codifica un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína a partir de la célula. La proteína se secreta en el medio de cultivo (bacterias gram positivas) o bien en el espacio periplasmático, situado entre la membrana interna y externa de la célula (bacterias gram negativas).
- 30 Preferentemente, existen sitios de procesamiento, que se pueden escindir *in vivo* o *in vitro* codificados entre el fragmento de péptido señal y el gen extraño.
- El ADN que codifica secuencias de señal adecuadas se puede derivar de genes para proteínas bacterianas secretadas, tales como el gen de la proteína de la membrana externa de *E. coli* (Masui y cols. (1983), en: *Experimental Manipulation of Gene Expression*; Ghayeb y cols. (1984) *EMBO J.* 3:2437) y la secuencia señal de fosfatasa alcalina de *E. coli* (phoA) (Oka y cols. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:7212). Como otro ejemplo, se puede usar la secuencia señal del gen de alfa amilasa de diferentes cepas de *Bacillus* para secretar proteínas heterólogas de *B. subtilis* (Palva y cols. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:5582; documento EP-A-0 244 042).
- 40 Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por las bacterias son regiones reguladoras localizadas corriente abajo 3' con respecto al codón de detención de la traducción y por tanto, junto con el promotor, flanquea la secuencia de codificación. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que se puede traducir en el polipéptido codificado por el ADN. Las secuencias de terminación de la transcripción incluyen frecuentemente secuencias de ADN de aproximadamente 50 nucleótidos que pueden formar estructuras de horquilla que ayudan en la terminación de la transcripción. Los ejemplos incluyen secuencias de terminación de la transcripción derivadas de genes con promotores fuertes, tales como el gen trp en *E. coli*, así como otros genes biosintéticos.
- 45 Normalmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, una secuencia señal (si se desea), una secuencia de codificación de interés y una secuencia de terminación de la transcripción, se introducen juntas en construcciones de expresión. A menudo, las construcciones de expresión se mantienen en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz de mantenimiento estable en un huésped, tal como bacterias. El replicón tendrá un sistema de replicación, permitiéndole así que se mantenga en un huésped procarionte para expresión o bien para clonación y amplificación. Además, un replicón puede ser un plásmido de alto o
- 50 bien de bajo número de copias. Un plásmido de alto número de copias tendrá generalmente un número de copias que varía desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 200 y normalmente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 150. Un huésped que contiene un plásmido de alto número de copias contendrá preferentemente al menos aproximadamente 10 y de más preferentemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. Se puede
- 60 seleccionar un vector de alto o bien de bajo número de copias, dependiendo del efecto del vector y de la proteína

extraña sobre el huésped.

De forma alternativa, las construcciones de expresión se pueden integrar en el genoma bacteriano con un vector de integración. Los vectores de integración contienen normalmente al menos una secuencia homóloga al cromosoma bacteriano que permite que se integre el vector. Parece que las integraciones resultan de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma bacteriano. Por ejemplo, los vectores de integración construidos con ADN de diversas cepas de *Bacillus* se integran en el cromosoma de *Bacillus* (documento EP-A-0 127 328). Los vectores de integración también pueden comprender secuencias de bacteriófagos o del transposón.

Normalmente, las construcciones de expresión extracromosómicas y de integración pueden contener marcadores seleccionables para permitir la selección de cepas bacterianas que se hayan transformado. Los marcadores seleccionables se pueden expresar en el huésped bacteriano y pueden incluir genes que hacen a las bacterias resistentes a fármacos, tales como ampicilina, cloramfenicol, eritromicina, kanamicina (neomicina) y tetraciclina (Davies y cols. (1978) Annu. Rev. Microbiol. 32:469). Los marcadores seleccionables también pueden incluir genes biosintéticos, tales como los de las vías de histidina, triptófano y leucina.

De forma alternativa, algunos de los componentes descritos anteriormente se pueden colocar conjuntamente en vectores de transformación. Los vectores de transformación comprenden normalmente un marcador seleccionable que se mantiene en un replicón o bien se desarrolla en un vector de integración, como se describe anteriormente.

Se han desarrollado vectores de expresión y transformación, bien replicones extracromosómicos o bien vectores de integración, para la transformación en muchas bacterias. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, entre otras, las siguientes bacterias: *Bacillus subtilis* (Palva y cols. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; documentos EP-A-0 036 259 y EP-A-0 063 953; WO 84/04541), *Escherichia coli* (Shimatake y cols. (1981) Nature 292:128; Amann y cols. (1985) Gene 40: 183; Studier y cols. (1986) J. Mol. Biol. 189:113; documentos EP-A-0 036 776, EPA-0 136 829 y EP-A-0 136 907), *Streptococcus cremoris* (Powell y cols. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655), *Streptococcus lividans* (Powell y cols (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655) y *Streptomyces lividans* (patente de los Estados Unidos 4.745.056).

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en huéspedes bacterianos se conocen bien en la técnica, y normalmente incluyen la transformación de una bacteria tratada con CaCl₂ u otros agentes, tales como cationes divalentes y DMSO. También se puede introducir ADN en células bacterianas por electroporación. Normalmente, los procedimientos de transformación varían con las especies bacterianas que se van a transformar. Véase, por ejemplo, (Masson y cols. (1989) FEMS Microbiol. Lett. 60:273; Palva y cols. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5582; documentos EP-A-0 036 259 y EP-A-0 063 953; WO 84/04541, *Bacillus*) (Miller y cols. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:856; Wang y cols. (1990) J. Bacteriol. 172:949, *Campylobacter*), (Cohen y cols. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 69:2110; Dower y cols. (1988) Nucleic Acids Res. 16:6127; Kushner (1978) "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI-derived plasmids. En Genetic Engineering: Proceedings of the International Symposium on Genetic Engineering (eds. H.W. Boyer y S. Nicosia); Mandel y cols. (1970) J. Mol. Biol. 53:159; Taketo (1988) Biochim. Biophys. Acta 949:318; *Escherichia*), (Chassy y cols. (1987) FEMS Microbiol. Lett. 44:173, *Lactobacillus*), (Fiedler y cols. (1988) Anal. Biochem 170:38, *Pseudomonas*), (Augustin y cols. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 66:203, *Staphylococcus*), (Barany y cols. (1980) J. Bacteriol. 144:698; Harlander (1987) "Transformation of *Streptococcus lactis* by electroporation, en: *Streptococcal Genetics* (ed. J. Ferretti y R. Curtiss 111); Perry y cols. (1981) Infect. Immun. 32:1295; Powell y cols: (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54:655; Somkuti y cols. (1987) Proc. 4º Evr. Cong. Biotechnology 1:412, *Streptococcus*).

v. Expresión de levaduras

En la técnica se conocen sistemas de expresión de levaduras. Un promotor de levadura es cualquier secuencia de ADN que se puede unir a la ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción corriente abajo 3' (3') de una secuencia de codificación (por ejemplo, gen estructural) en ARNm. Un promotor tendrá una región de inicio de la transcripción que normalmente se sitúa próxima al extremo 5' de la secuencia de codificación. Normalmente, esta región de inicio de la transcripción incluye un sitio de unión a la ARN polimerasa (la "secuencia TATA") y un sitio de inicio de la transcripción. Un promotor de levadura también puede tener un segundo dominio denominado secuencia activadora corriente abajo 3' (UAS), que, si está presente, normalmente es distal al gen estructural. La UAS permite la expresión regulada (inducible). La expresión constitutiva se produce en ausencia de una UAS, pero se puede potenciar con una o más UAS. La expresión regulada puede ser positiva o bien negativa, potenciando o bien reduciendo de este modo la transcripción.

La levadura es un organismo fermentador con una vía metabólica activa, por lo tanto las secuencias que codifican enzimas en la vía metabólica proporcionan secuencias promotoras particularmente útiles. Los ejemplos incluyen alcohol deshidrogenasa (ADH) (documento EP-A-0 284 044), enolasa, glucocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAP o GAPDH), hexocinasa, fosfofructocinasa, 3-fosfoglicerato mutasa, y piruvato cinasa (PyK) (documento EPO-A-0 329 203). El gen PH05 de levadura, que codifica la fosfatasa ácida, también proporciona secuencias promotoras útiles (Myanohara y cols. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 1).

- Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también funcionan como promotores de levaduras. Por ejemplo, las secuencias UAS de un promotor de levadura se pueden unir con la región de activación de la transcripción de otro promotor de levadura, creando un promotor híbrido sintético. Los ejemplos de estos promotores híbridos incluyen la secuencia reguladora ADH unida a la región de activación de la transcripción GAP (patentes de EEUU N.º 4.876.197 y 4.880.734). Otros ejemplos de promotores híbridos incluyen promotores que consisten en las secuencias reguladoras de cualquiera de los genes AD112, GAL4, GAL10 o PH05, combinadas región de activación transcripcional de un gen de enzima glicolítica tal como GAP o PyK (documento EP-A-0 164 556). Además, un promotor de levadura puede incluir promotores de origen natural y no de levadura que tengan la capacidad de unirse a ARN polimerasa de levadura e iniciar la transcripción. Los ejemplos de estos promotores incluyen, entre otros, (Cohen y cols. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:1078; Henikoff y cols. (1981) Nature 283:835; Hollenberg y cols. (1981) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96:119; Hollenberg y cols. (1979) "The Expression of Bacterial Antibiotic Resistance Genes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*," en: Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance (eds. K.N. Timmis y A. Puhler); Mercerau-Puigalon y cols. (1980) Gene 11:163; Panthier y cols. (1980) Curr. Genet. 2:109).
- Una molécula de ADN se puede expresar intracelularmente en levadura. Se puede unir directamente una secuencia promotora con la molécula de ADN, caso en el que el primer aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína recombinante será siempre una metionina, que está codificada por el codón de inicio ATG. Si se desea, se puede escindir la metionina en el extremo N-terminal de la proteína por incubación *in vitro* con bromuro de cianógeno.
- Las proteínas de fusión proporcionan una alternativa para los sistemas de expresión de levaduras, así como en sistemas de expresión de mamíferos, baculovirus y bacterianos. Normalmente, una secuencia de ADN que codifica la porción N-terminal de una proteína de levadura endógena, u otra proteína estable, se fusiona con el extremo 5' de las secuencias codificadoras heterólogas. Después de la expresión, esta construcción proporcionará una fusión de las dos secuencias de aminoácidos. Por ejemplo, el gen de la superóxido dismutasa (SOD) de levadura o humana se puede unir en el extremo 5' terminal de un gen extraño y se puede expresar en bacterias. La secuencia de ADN en la unión de las dos secuencias de aminoácidos puede o no codificar un sitio escindible. Véase, por ejemplo, el documento EP-A-0 196 056. Otro ejemplo es una proteína de fusión de ubiquitina. Una proteína de fusión de este tipo se prepara con la región de ubiquitina que conserva preferentemente un sitio para una enzima de procesamiento (por ejemplo, una proteasa de procesamiento específica de ubiquitina) para escindir la ubiquitina de la proteína extraña. A través de este procedimiento, se puede aislar una proteína extraña natural (por ejemplo, el documento WO88/024066).
- De forma alternativa, las proteínas extrañas también se pueden secretar de la célula en el medio de crecimiento creando moléculas de ADN quiméricas que codifican una proteína de fusión que comprende un fragmento de secuencia líder que proporciona la secreción en la levadura de la proteína extraña. Preferentemente, existen sitios de procesamiento codificados entre el fragmento líder y el gen extraño que se pueden escindir *in vivo* o *in vitro*. El fragmento de la secuencia líder normalmente codifica un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína a partir de la célula.
- El ADN que codifica secuencias señal adecuadas se puede obtener a partir de genes para proteínas de levaduras secretadas, tales como el gen de la invertasa de levadura (documentos EP-A-0 012 873; JPO. 62.096.086) y el gen del factor A (patente de los Estados Unidos 4.588.684). De forma alternativa, existen líderes de origen diferente de levadura, tales como un líder de interferón, que también proporcionan la secreción en levaduras (documento EP-A-0 060 057).
- Una clase preferida de secuencias líderes de secreción es la que emplea un fragmento del gen del factor alfa de levadura, que contiene tanto una secuencia señal "pre" como una región "pro". Los tipos de fragmentos del factor alfa que se pueden emplear incluyen el líder de factor alfa pre-pro de longitud completa (de aproximadamente 83 residuos de aminoácidos) así como los líderes de factor alfa truncados (normalmente de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos) (patentes de los Estados Unidos 4.546.083 y 4.870.008; documento EP-A-0 324 274). Otros líderes que emplean un fragmento líder de factor alfa que proporciona la secreción incluyen líderes de factor alfa híbridos preparados con una presecuencia de una primera levadura, pero una región pro de un factor alfa de una segunda levadura. (Véase, por ejemplo, el documento WO 89/02463.) Normalmente, las secuencias de terminación de la transcripción reconocidas por la levadura son regiones reguladoras situadas corriente abajo 3' con respecto al codón de terminación de la traducción, y por tanto junto con el promotor flanquean la secuencia de codificación. Estas secuencias dirigen la transcripción de un ARNm que se puede traducir en el polipéptido codificado por el ADN. Los ejemplos de secuencia de terminación de la transcripción y otras secuencias de terminación reconocidas por la levadura, tales como las que codifican enzimas glicolíticas.
- Normalmente, los componentes descritos anteriormente, que comprenden un promotor, un líder (si se desea), una secuencia de codificación de interés y una secuencia de terminación de la transcripción, se introducen juntas en construcciones de expresión. A menudo, las construcciones de expresión se mantienen en un replicón, tal como un elemento extracromosómico (por ejemplo, plásmidos) capaz de mantenimiento estable en un huésped, tal como levaduras o bacterias. El replicón puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo así que se mantenga, por ejemplo, en levadura para la expresión y en un huésped procariota para la clonación y la amplificación. Los ejemplos de estos vectores transportadores de levadura-bacteria incluyen YE_p24 (Botstein y cols. (1979) Gene 8:17-24), pCI/

(Brake y cols. (1984) PNAS USA 81:4642-4646), y YRp17 (Stinchcomb y cols. (1982) J. Mol. Biol. 158:157). Además, un replicón puede ser un plásmido de alto o bien de bajo número de copias. Un plásmido de alto número de copias tendrá generalmente un número de copias que varía desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 200 y normalmente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 150. Un huésped que contiene un plásmido de alto número de copias tendrá preferentemente al menos aproximadamente 10 y de más preferentemente al menos aproximadamente 20 plásmidos. Se puede seleccionar un vector de alto o bien de bajo número de copias, dependiendo del efecto del vector y la proteína extraña sobre el huésped. Véase, por ejemplo Brake y cols., *supra*.

De forma alternativa, las construcciones de expresión se pueden integrar en el genoma de levadura con un vector de integración. Normalmente, los vectores de integración contienen al menos una secuencia homóloga a un cromosoma de levadura que permite que el vector se integre, y preferentemente contienen dos secuencias homólogas que flanquean a la construcción de expresión. Parece que las integraciones son el resultado de recombinaciones entre ADN homólogo en el vector y el cromosoma de levadura (Orr-Weaver y cols. (1983) Methods in Enzymol. 101:228-245). Un vector de integración se puede dirigir a un locus específico en la levadura seleccionando la secuencia homóloga apropiada para la inclusión en el vector. Véase, Orr-Weaver y cols., *supra*. Se pueden integrar una o más construcciones de expresión, afectando posiblemente a los niveles de la proteína recombinante producida (Rine y cols. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:6750). Las secuencias cromosómicas incluidas en el vector pueden aparecer como un único segmento en el vector, lo que da como resultado la integración del vector completo, o bien como dos segmentos homólogos a segmentos adyacentes en el cromosoma y que flanquean la construcción de expresión en el vector, lo que puede dar como resultado la integración estable sólo de la construcción de expresión.

Normalmente, las construcciones de expresión extracromosómicas y de integración pueden contener marcadores seleccionables para permitir la selección de cepas de levadura que se hayan transformado. Los marcadores seleccionables pueden incluir genes biosintéticos que se pueden expresar en el huésped de levadura, tales como ADE2, HIS4, LEU2, TRP1 y ALG7 y el gen de resistencia a G418, que confiere resistencia en células de levaduras a tunicamicina y G418, respectivamente. Además, un marcador seleccionable adecuado también puede proporcionar a la levadura la capacidad de crecer en presencia de compuestos tóxicos, tales como metal. Por ejemplo, la presencia de CUP1 permite a la levadura crecer en presencia de iones de cobre (Butt y cols. (1987) Microbiol. Rev. 51:351). De forma alternativa, algunos de los componentes descritos anteriormente se pueden colocar conjuntamente en vectores de transformación. Los vectores de transformación comprenden normalmente un marcador seleccionable que se mantiene en un replicón o bien se desarrolla en un vector de integración, como se describe anteriormente.

Se han desarrollado vectores de expresión y transformación, bien replicones extracromosómicos o bien vectores de integración, para la transformación en muchas levaduras. Por ejemplo, se han desarrollado vectores de expresión para, entre otras, las siguientes levaduras: *Candida albicans* (Kurtz, y cols. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:142), *Candida maltosa* (Kunze, y cols. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141), *Hansenula polymorpha* (Gleeson, y cols. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:3459; Roggenkamp y cols. (1986) Mol. Gen. Genet. 202:302), *Kluyveromyces fragilis* (Das, y cols. (1984) J. Bacteriol. 158:1165), *Kluyveromyces lactis* (De Louvencourt y cols. (1983) J. Bacteriol. 154:737; Van den Berg y cols. (1990) Biol Technology 8:135), *Pichia guilliermondii* (Kunze y cols. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141), *Pichia pastoris* (Cregg, y cols. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3376; patentes de los Estados Unidos N.º 4.837.148 y 4.929.555), *Saccharomyces cerevisiae* (Hinnen y cols. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929; Ito y cols. (1983) J. Bacteriol. 153:163), *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse (1981) Nature 300:706) y *Yarrowia lipolytica* (Davidow, y cols. (1985) Curr. Genet. 10:39; Gaillardin, y cols. (1985) Curr. Genet. 10:49).

Los procedimientos para introducir ADN exógeno en los huéspedes de levadura son bien conocidos en la técnica, y normalmente incluyen la transformación de esferoplastos o de células de levadura intactas tratadas con cationes alcalinos. Normalmente, los procedimientos de transformación varían con las especies de levadura que se van a transformar. Véase, por ejemplo, (Kurtz y cols. (1986) Mol. Cell. Biol. 6:142; Kunze y cols. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141; *Candida*); (Gleeson y cols. (1986) J. Gen. Microbiol. 132:3459; Roggenkamp y cols. (1986) Mol. Gen. Genet. 202:302; *Hansenula*); (Das y cols. (1984) J. Bacteriol. 158:1165; De Louvencourt y cols. (1983) J. Bacteriol. 154:1165; Van den Berg y cols. (1990) BiolTechnology 8:135; *Kluyveromyces*); (Cregg y cols. (1985) Mol. Cell. Biol. 5: 3376; Kunze y cols. (1985) J. Basic Microbiol. 25:141; patentes de los Estados Unidos N.º 4.837.148 y 4.929.555; *Pichia*); (Hinnen y cols. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929; Ito y cols. (1983) J. Bacteriol. 153:163; *Saccharomyces*); (Beach y Nurse (1981) Nature 300:706; *Schizosaccharomyces*); y (Davidow y cols. (1985) Curr. Genet. 10:39; Gaillardin y cols. (1985) Curr. Genet. 10:49; *Yarrowia*).

Purificación de los confórmeros

Los confórmeros de la presente invención se purifican preferentemente a al menos aproximadamente una pureza del 80%, a al menos aproximadamente una pureza del 90%, a al menos aproximadamente una pureza del 95%, o a más de una pureza del 95% con respecto a macromoléculas contaminantes, en particular otras proteínas y ácidos nucleicos, y libre de agentes infecciosos y pirogénicos. Los confórmeros de la presente invención también pueden ser purificados a un estado farmacéuticamente puro, que es mayor de al menos aproximadamente una pureza del 99,5% o preferentemente mayor de al menos aproximadamente una pureza del 99,9%. En determinadas realizaciones, los confórmeros purificados o aislados están sustancialmente libres de otros confórmeros de la proteína. Preferentemente, el confórmero purificado o aislado tendrá menos de al menos aproximadamente el 20% de otros

- 5 confórmeros, menos de al menos aproximadamente el 15% de otros confórmeros, menos de al menos aproximadamente el 10% de otros confórmeros, menos de al menos aproximadamente el 5% de otros confórmeros, menos de al menos aproximadamente el 2% de otros confórmeros, o menos de al menos aproximadamente el 1% de otros confórmeros de la proteína. En determinadas realizaciones, puede no ser necesario ni deseable retirar todos los demás confórmeros, en cuyo caso el confórmero purificado o aislados puede tener entre aproximadamente el 20% y aproximadamente el 1% de otros confórmeros, entre aproximadamente el 15% y aproximadamente el 1% de otros confórmeros, entre aproximadamente el 10% y aproximadamente el 1% de otros confórmeros, entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 1% de otros confórmeros, o entre aproximadamente el 2% y aproximadamente el 1% de otros confórmeros.
- 10 La proteína de adhesina bacteriana o los polipéptidos de la misma se pueden purificar por cualquier procedimiento de fraccionamiento y/o purificación disponible. Véase, por ejemplo, Robert K. Scopes, "Protein Purification. Principles and Practice," (4ª ed. 2000, Springer Verlag). En general, se puede usar la precipitación de sulfato de amonio y la extracción ácida o de caótropro para el fraccionamiento de muestras. Las etapas de purificación ejemplares pueden incluir cromatografía de hidroxapatita, de exclusión por tamaño, FPLC y líquida de alto rendimiento de fase inversa.
- 15 Los medios cromatográficos adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poli(acrilamida), sílices especializados y similares. PEI, DEAE, QAE y derivados de Q son ejemplos preferidos de intercambio aniónico. Los medios cromatográficos ejemplares incluyen los medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como fenil-Sefarosa FF (Pharmacia), Toyopearl butil 650 (Toso Haas, Montgomeryville, Pa.), octil-Sefarosa (Pharmacia) y similares; o resinas poli(acrilicas), tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticuladas, perlas de poliestireno, resinas de poli(acrilamida) reticuladas y similares que son insolubles bajo las condiciones en las que se van a usar. Estos soportes se pueden modificar con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfidrido, grupos hidroxilo y/o restos carbohidrato.
- 20 Los ejemplos de química de acoplamiento incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfidrido, activación con hidrazida y derivados de carboxilo y amino para la química de acoplamiento con carbodiimida. Estos y otros medios sólidos son muy conocidos y se usan ampliamente en la técnica, y están disponibles de proveedores comerciales. La selección de un procedimiento particular para el aislamiento y la purificación de polipéptidos es una cuestión de diseño rutinario y se determina en parte por las propiedades del soporte elegido. Véase, por ejemplo, Affinity Chromatography: Principles & Methods 18-1022-29 (2002), disponible de Amersham Biosciences, y Doonan, Protein Purification Protocols (The Humana Press 1996).
- 25 Los expertos en la técnica pueden diseñar variaciones adicionales en el aislamiento y la purificación de las proteínas adhesinas bacterianas o polipéptidos de las mismas. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos dirigidos a las proteínas adhesinas bacterianas para aislar grandes cantidades de proteínas por purificación por inmunoespecificidad.
- 30 Los polipéptidos de la presente invención también se pueden aislar aprovechando sus propiedades particulares. Por ejemplo, se puede usar cromatografía de adsorción de iones metálicos inmovilizados (IMAC) para purificar proteínas ricas en histidina, incluyendo las que comprenden etiquetas de polihistidina. En resumen, en primer lugar se carga un gel con iones metálicos divalentes para formar un quelato (Sulkowski, Trends en Biochem. 3:1 (1985)). Las proteínas ricas en histidina se adsorberán a esta matriz con afinidades diferentes, dependiendo del ión metálico usado, y se eluirán por elución competitiva, disminuyendo el pH, o el uso de agentes quelantes fuertes. Otros procedimientos de purificación incluyen la purificación de proteínas glucosiladas por cromatografía de afinidad de lectina y cromatografía de intercambio iónico (M. Deutscher, (ed.), Meth. Enzymol. 182:529 (1990)). Dentro de otras realizaciones de la invención, se puede construir una fusión del polipéptido de interés y una etiqueta de afinidad (por ejemplo, proteína de unión a maltosa, un dominio de inmunoglobulina) para facilitar la purificación.
- 35 También se pueden preparar proteínas adhesinas bacterianas o especialmente polipéptidos de las mismas a través de síntesis química. Las proteínas adhesinas bacterianas o polipéptidos de las mismas pueden ser monómeros o multímeros; glucosiladas o no glucosiladas; PEGiladas o no PEGiladas; y pueden incluir o no un residuo inicial de aminoácido metionina.

Separación de los confórmeros

- 50 Los confórmeros de adhesinas bacterianas se pueden purificar o aislar por cualquier tecnología de purificación o de separación o procedimiento que pueda diferenciar los confórmeros basándose en sus características biofísicas diferenciadas. Los ejemplos preferidos de estas tecnologías son tecnologías que diferencien basándose en coeficientes de fricción diferenciados, distribuciones de carga diferenciadas, afinidad diferenciada por cationes o aniones particulares tales como calcio o fosfato como se encuentra en hidroxapatita, o la presentación diferenciada de antígenos de superficie.
- 55 Los ejemplos preferidos de tecnologías que pueden separar los confórmeros de adhesinas bacterianas basadas en diferencias en sus coeficientes de fricción son cromatografía de exclusión por tamaño, centrifugación por velocidad de sedimentación, fraccionamiento de flujo rápido y electroforesis en gel. El coeficiente de fricción de una molécula se

basa en la masa y la forma de la molécula. Una teoría general desarrollada para entender el transporte de moléculas en una solución acuosa se denomina hidrodinámica. La ley de Stoke describe la relación entre el coeficiente de fricción f_0 y la viscosidad μ del medio:

$$f_0 = 6\pi\eta R$$

5 donde R es el radio de Stoke de la molécula. Para macromoléculas esféricas, el radio de Stokes de la molécula es el radio de la macromolécula esférica más su esfera de solvatación. Para macromoléculas que no son esféricas, el radio de Stokes es el radio de una molécula esférica que tendría un coeficiente de fricción equivalente. Las moléculas no esféricas tendrán siempre un mayor coeficiente de fricción que el de una molécula esférica del mismo peso molecular y solvatación. Por lo tanto, una desviación de la molécula de una forma esférica perfecta se puede representar como f/f_0 donde f es el coeficiente de fricción real de la molécula y f_0 es el coeficiente de fricción de una molécula esférica con el mismo peso molecular y solvatación. Para las moléculas esféricas, $f/f_0 = 1$ y para moléculas no esféricas, $f/f_0 > 1$. Por lo tanto, los confómeros con diferentes formas y, por lo tanto, diferentes coeficientes de fricción se pueden separar en base a sus diferentes coeficientes de fricción, como se demuestra en el ejemplo 2, a continuación.

15 Un procedimiento preferido de separación confómeros de adhesinas bacterianas basado en sus coeficientes de fricción diferenciados es la cromatografía de exclusión por tamaño o de filtración de gel. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente resinas y tampones adecuados. Los ejemplos de resinas de exclusión por tamaño incluyen, pero no se limitan a, Superdex 75, Superose 12 y Sephacryl 100. Se puede seleccionar cualquier condición de tampón basada en las condiciones que estabilizan adecuadamente el confómero de adhesina bacteriana siempre que la resina tolere las condiciones del tampón. Para principios generales de cromatografía de exclusión por tamaño incluyendo condiciones exploratorias iniciales, optimización y escalado, véase "Gel Filtration: Principles and Methods," 18-1022-18 (2002), disponible de Amersham Biosciences.

25 El fraccionamiento campo-flujo (FFF) es otro procedimiento que se puede usar para separar o purificar los confómeros basado en coeficientes de fricción diferenciados. A modo de ejemplo, pero sin limitación, se puede usar el FFF de sedimentación en el que el canal de fraccionamiento se añade dentro de un tazón de centrifugado. El girado del canal genera fuerzas de aceleración diferenciales en ángulos rectos con respecto al flujo. El tiempo de retención en el FFF de sedimentación depende de la dimensión de las partículas y de la densidad. Otro ejemplo es el FFF de flujo, que tiene un amplio rango de aplicaciones. Se puede separar casi todas las macromoléculas, sistemas coloidales y dispersiones particuladas. En el FFF de flujo, se superponen dos corrientes de flujo cruzado en el mismo canal. Las paredes del canal en el FFF de flujo son permeables. El tamaño de poro de la membrana determina el límite de menor tamaño límite para la separación. La fuerza de conducción en el FFF es la fuerza viscosa ejercida sobre una partícula por la corriente de flujo cruzado y la separación se basa en el tamaño solo, con tiempos de retención proporcionales al diámetro de las partículas y a la conformación.

35 También se puede usar electroforesis en gel preparativa para separar o purificar los confómeros basándose en sus coeficientes de fricción diferentes. Preferentemente, la electroforesis en gel será natural, pero también se pueden usar condiciones de desnaturalización, tales como SDS, dado que el confómero F es resistente a la desnaturalización por SDS como se demuestra en el ejemplo 2 a continuación. Se puede usar cualquier gel adecuado, aunque se prefieren agarosa o acrilamida. Después de la electroforesis, se pueden recuperar las proteínas por difusión pasiva o electroelución. Para mantener la integridad de las proteínas durante la electroforesis, es importante mantener el aparato frío y minimizar los efectos de la desnaturalización y de la proteólisis.

40 Otro procedimiento preferido de separación o aislamiento de los confómeros de adhesinas bacterianas es la tecnología de separación por intercambio de iones. Se puede usar cualquiera de un gran número de resinas de intercambio de aniones conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, monoQ, sefarosa-Q, macro-prepQ, AG1-X2, HiQ, así como resinas basadas en DEAE. Se puede lograr la elución con soluciones acuosas de sal incluyendo, sin limitación, cloruro de potasio o cloruro de sodio en concentraciones que varían de desde 0,01 M hasta 2,0 M sobre un amplio rango de pH. De forma alternativa, se puede lograr la elución por medios alternativos, tales como gradientes de pH. Para técnicas de separación por intercambio de iones, véase en general, "Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods," 18-1114-21 (2002), disponible de Amersham Biosciences.

50 Otra tecnología de separación preferida para la diferenciación de los confómeros de adhesinas bacterianas es la hidroxiapatita. La hidroxiapatita es una resina basada en fosfato de calcio, como tal puede funcionar tanto como una resina de intercambio catiónico como una resina de intercambio aniónico. Se puede usar una amplia variedad de resinas de intercambio catiónico incluyendo a modo de ejemplo resinas basadas en sulfato, resinas basadas en carboxilato y resinas basadas en fosfato.

55 Además, determinadas proteínas se comportan de forma diferente sobre hidroxiapatita que sobre otras resinas de intercambio catiónico o aniónico debido a una mayor afinidad para el calcio o bien el fosfato. A modo de ejemplo, a menudo las proteínas de unión a ADN se unen más fuertemente a hidroxiapatita que a otras resinas de intercambio catiónico debido a que las proteínas de unión a ADN tienen bolsillos de unión para el esqueleto de fosfato de ADN. Por

lo tanto, además de hidroxiapatita, se pueden usar resinas basadas en fosfato, tales como fosfo-celulosa, en la separación o aislamiento de confórmers de adhesinas bacterianas. De forma similar, se pueden usar tecnologías de separación por afinidad de metal divalente inmovilizado, en las que las proteínas tienen afinidad por iones de metales divalentes tales como calcio o magnesio.

5 Otro ejemplo de una tecnología de purificación que puede separar los confórmers bacterianos es la afinidad por anticuerpo, preferentemente anticuerpos monoclonales. Como se demuestra en los ejemplos a continuación, los confórmers de adhesinas bacterianas tienen inmunogenicidades diferentes. Probablemente, las diferentes inmunogenicidades se deben en parte a que los confórmers tienen diferentes antígenos expuestos en su superficie, lo que podía incluir una accesibilidad de bucles diferente o una estructura de superficie tridimensional diferente. Por
10 tanto, se pueden aislar los anticuerpos que son específicos a uno o a un número limitado de confórmers. A modo de ejemplo, se pueden generar anticuerpos inmunizando un animal con el confórmer F de una adhesina bacteriana. Después, se pueden purificar los anticuerpos policlonales específicos para el confórmer F aislado anticuerpos del suero del animal y haciendo fluir los anticuerpos por el confórmer A que se ha inmovilizado sobre un soporte sólido. Los anticuerpos que sólo reconocen el confórmer F y no el confórmer A no se unirán y, por lo tanto, se pueden
15 separar del soporte sólido. De forma alternativa, se pudo generar hibridoma que produce anticuerpos monoclonales a partir del animal y los anticuerpos monoclonales se pudieron rastrear para determinar su capacidad para unirse al confórmer F y no al confórmer A. Se pueden usar estos anticuerpos, que son específicos para un confórmer, para separar o aislar el confórmer. Las tecnologías de purificación por afinidad de anticuerpos son muy conocidas y fácilmente disponibles.

20 Rastreo

Otro aspecto de la presente divulgación incluye el rastreo del confórmer F de la adhesina bacteriana. Se puede realizar este rastreo con una amplia variedad de fines incluyendo, a modo de ejemplo, seleccionar los confórmers más inmunogénicos para maximizar la respuesta inmunitaria en el receptor de la vacuna, rastrear candidatos para la
25 vacuna multi-componente para determinar la respuesta inmunitaria a todos los componentes, rastrear confórmers inmunogénicos para determinar si no hay efectos secundarios o si son limitados, y cualquier otra característica que el experto en la técnica desee, ejemplos no limitantes de esto se pueden encontrar en toda la especificación.

Se puede someter a ensayo la inmunogenicidad del confórmer F por cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica. Normalmente, la presencia (o ausencia), los títulos, las afinidades, las avidedces, etc. de anticuerpos generados *in vivo* se someten a prueba por procedimientos estándar, tales como, pero sin limitarse a, ensayos de
30 ELISA, por el que se somete a prueba la inmunogenicidad o antigenicidad sobre inmunoglobulina presentes en el suero de un organismo (o paciente). Se pueden aplicar procedimientos adicionales, tales como generar hibridomas de linfocitos T y medir la activación en presencia de células que presentan antígeno ("APC") y antígeno (Surman S y cols., 2001 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 4587-92, a continuación), examinar péptidos que presentan MHC marcada o no marcada por cromatografía, electroforesis, y/o espectroscopia de masa, ensayos de activación de linfocitos T, tales como, pero sin limitarse a, ensayos de proliferación de linfocitos T (Adorini L y cols., 1988. J. Cad. Med. 168: 2091; So
35 T. y cols., 1996. Immunol. Let. 49: 91-97) y producción de IL-2 por ensayos de respuesta proliferativa de células CTLL-2 (Gillis S y cols., 1978. J. Immunol. 120: 2027; So T. y cols., 1996. Immunol. Let. 49: 91-97) y muchos otros para determinar aspectos más específicos de una respuesta inmunitaria, o la falta de la misma, tales como, por ejemplo, la identidad del epítipo de linfocitos T inmunogénicos del antígeno.

40 Como ejemplos específicos no limitantes, se pueden llevar a cabo ensayos de linfocitos T *in vitro*, en los que el polipéptido, la proteína, o el complejo de proteínas se puede procesar y presentar en el surco de moléculas de MHC por células que presentan antígenos apropiadas (APC) a linfocitos T singénicos. Se pueden medir las respuestas de linfocitos T por medidas de proliferación simple o midiendo la liberación de citocina específica por células activadas; se pueden irradiar las APC o tratarse de otro modo para evitar la proliferación para facilitar la interpretación de los
45 resultados de estos ensayos. Para determinar la inmunogenicidad de un epítipo en el contexto de diferentes aloantígenos de MHC, se pueden llevar a cabo ensayos *in vivo* usando APC singénicas y linfocitos T de un rango de alotipos para someter a prueba los epítipos de linfocitos T en un grupo de individuos o pacientes.

De forma alternativa, se pueden usar animales transgénicos que expresan moléculas de MHC de seres humanos (o cualquier otra especie de interés) para el ensayo de epítipos de linfocitos T; en una realización preferida, este ensayo
50 se lleva a cabo en animales transgénicos en los que se ha desactivado el repertorio de MHC endógena y, mejor aún, en los que una o más de otras moléculas secundarias del complejo de MHC endógena/receptor de linfocitos T se han reemplazado con moléculas humanas (o moléculas de cualquier otra especie de interés), tales como, por ejemplo, la molécula CD4.

Además, para detectar anticuerpos anti-proteína/antígeno/polipéptido inmunogénico directamente *in vivo*, por ejemplo, en estudios clínicos y en animales, se pueden usar ensayos de ELISA, tales como, por ejemplo, ensayos de ELISA indirectos de fase sólida, para detectar la unión de anticuerpos. En una realización específica, se incuban las placas de microtitulación con el polipéptido inmunogénico de interés a una concentración apropiada y en un tampón adecuado. Después de lavados con una solución de lavado apropiada, tal como, por ejemplo, PBS (pH 7,4), PBS que contiene BSA al 1% y Tween 20 al 0,05%, o cualquier otra solución de este tipo como pueda ser apropiado, se diluyen las

muestras de suero, por ejemplo en PBS/BSA, y se añaden volúmenes iguales de las muestras por duplicado a los pocillos. Se incuban las placas, y después de lavados adicionales, por ejemplo con PBS, se añaden anticuerpos anti-inmunoglobulina acoplados/conjugados con un indicador, tal como un isótopo radioactivo o fosfatasa alcalina, a cada pocillo en una concentración apropiada, y se incuban. Después se lavan de nuevo los pocillos y, por ejemplo, en el caso del uso de fosfatasa alcalina como indicador, se lleva a cabo la reacción enzimática usando un sustrato colorimétrico, tal como p-nitrofenil fosfato en tampón de dietanolamina (pH 9,8), absorbancia que se puede leer a 405 nm, por ejemplo, en un lector de ELISA automático (por ejemplo, Multiskan PLUS; Labsystems).

Como ejemplo no limitante adicional, para detectar anticuerpos en el suero de pacientes y animales, también se puede aplicar inmunotransferencia. En una realización específica, una cantidad apropiada del polipéptido inmunogénico de interés por muestras/carril se desplaza sobre geles (por ejemplo, polacrilamida), bajo condiciones reductoras y/o no reductoras, y el polipéptido se transfiere a una membrana, tal como, por ejemplo, membranas PVDF; se puede usar cualquier otro procedimiento para separar proteínas por tamaño seguido de transferencia del polipéptido a una membrana. Se bloquean las membranas usando, por ejemplo, una solución de polvo de leche al 5% (p/v) en PBS. En otra realización, se puede aplicar polipéptido inmunogénico purificado a la membrana. Después se incuban las bandas con muestras de suero a diluciones variables en la solución de bloqueo (antes y después del régimen de inyección) y anti-antígeno de control, hasta que estas muestras estén disponibles. Las bandas se lavarán cuatro veces con una solución de lavado apropiado, y se incubarán adicionalmente con anti-inmunoglobulina conjugada con indicador a diluciones apropiadas/especificadas durante periodos de tiempo apropiados/especificados bajo condiciones apropiadas/especificadas. Se lavan de nuevo las bandas con una solución de lavado apropiada, y se visualizan las bandas de proteínas inmunorreactivas, por ejemplo, en el caso del uso de anti-inmunoglobulina conjugada con peroxidasa de rábano picante, usando reactivos quimioluminiscentes potenciados comercializados por Amersham (Bucks, Reino Unido).

Para someter a prueba el efecto neutralizante de anticuerpos generados *in vivo* (pacientes o animales), se puede determinar una actividad biológica relevante del patógeno de interés, por ejemplo, usando los bioensayos, tales como, por ejemplo, ensayos de proliferación celular o adhesión de huésped, en concentraciones variables de suero de individuos o animales expuestos/inmunizados con el polipéptido inmunogénico de interés. Se lavan células con crecimiento exponencial del patógeno y se resuspenden hasta una concentración consistente y apropiada en el medio de crecimiento en una serie de diluciones en serie, y se añade en alícuotas a cada pocillo. Para neutralización, se añade una serie de diluciones de suero antes y después de la exposición *in vivo* (inmunización) a los pocillos. Se incuban las placas durante un periodo de tiempo apropiado (dependiendo del patógeno). Se determina la tasa de crecimiento del patógeno en cada pocillo.

Un procedimiento preferido de rastreo para inmunogenicidad es por el ensayo de inmunización materna activa. Como se debate en el ejemplo 1, se puede usar este ensayo para medir títulos de suero de los ratones hembra durante el programa de inmunización así como el tiempo de supervivencia de las crías después de la exposición. El experto puede usar los otros procedimientos de rastreo para determinar la antigenicidad o la inmunogenicidad de los polipéptidos inmunogénicos de la presente invención establecidos en esta especificación y en la técnica para el rastreo de polipéptidos inmunogénicos.

Se pueden usar procedimientos de rastreo para determinar la antigenicidad o inmunogenicidad para seleccionar polipéptidos inmunogénicos de interés a partir de grupos de dos o más, tres o más, cinco o más, diez o más, o cincuenta o más polipéptidos inmunogénicos de la presente invención basándose en un criterio. Un experto en la técnica puede aplicar cualquier criterio deseado en la selección del polipéptido inmunogénico de interés. El criterio dependerá el uso deseado del polipéptido inmunogénico de interés. A modo de ejemplo, pero sin limitación, el criterio puede ser tan sencillo como seleccionar el polipéptido con la mayor antigenicidad o inmunogenicidad. También se puede usar un criterio más complicado tal como seleccionar el polipéptido con la mayor antigenicidad o inmunogenicidad que produce efectos secundarios no indeseados después de la inmunización o seleccionar una vacuna multicomponente que incluye el polipéptido inmunogénico que tiene la mayor antigenicidad o inmunogenicidad frente a un panel de patógenos. La determinación del criterio es una cuestión sencilla de diseño experimental basado en el uso deseado y, por lo tanto, un experto en la técnica no tendrá dificultad en seleccionar los criterios apropiados para cualquier situación.

Combinaciones

Se puede administrar el confórmero purificado F como una vacuna en niveles apropiados, solo o bien en combinación con otros antígenos, tales como proteínas no-adhesinas o polisacáridos.

Otros antígenos de GBS

Otro aspecto de la presente invención incluye una combinación del confórmero F de GBS80, con otros antígenos de GBS. Preferentemente, la combinación de antígenos de GBS consiste en tres, cuatro, cinco, seis, de siete, ocho, nueve o diez antígenos de GBS. Aún más preferentemente, la combinación de antígenos de GBS consiste en tres, cuatro o cinco antígenos de GBS. Tales combinaciones pueden incluir fragmentos de longitud completa y/o antígenos de los respectivos antígenos e incluyen combinaciones en las que los polipéptidos y los antígenos están

físicamente unidos entre sí y combinaciones en las que los polipéptidos y los antígenos no están físicamente unidos pero están incluidos en la misma composición.

5 Preferentemente, las combinaciones de la invención proporcionan una mejora en la inmunogenicidad sobre la inmunogenicidad del confórmero cuando se administra solo. Se puede medir la mejora en la inmunogenicidad, por ejemplo, por el ensayo de inmunización materna activa. Se puede usar este ensayo para medir títulos de suero de los ratones hembra durante el programa de inmunización así como el tiempo de supervivencia de las crías después de la exposición. Preferentemente, la inmunización con las composiciones inmunogénicas de la invención proporciona un incremento de al menos 2 puntos en porcentaje (preferentemente, al menos 3, 4 ó 5 puntos en porcentaje) en el porcentaje de supervivencia de las crías expuestas en comparación con el porcentaje de supervivencia de inmunización materna con un único antígeno de la composición cuando se administra solo. Preferentemente, el incremento es de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 puntos en porcentaje. Preferentemente, las combinaciones de GBS de la invención que comprenden GBS 80 demuestran un incremento en el porcentaje de supervivencia en comparación con el porcentaje de supervivencia de inmunización con un antígeno no-GBS 80 solo.

15 En una realización, la combinación puede consistir en de dos a trece antígenos de GBS seleccionados de un grupo de antígenos que consiste en GBS 91, GBS 293, GBS 104, GBS 67, GBS 184, GBS 276, GBS 322, GBS 305, GBS 330, GBS 338, GBS 361, GBS 404, GBS 690 y GBS 691. Preferentemente, la combinación incluye el confórmero F de GBS 80 en combinación con uno o más de GBS 104, GBS 59, GBS 67 y GBS 322. Las secuencias de polinucleótidos y de aminoácidos para cada uno de estos antígenos de GBS y fragmentos inmunogénicos de los mismos se describen en el documento WO04041157.

20 De acuerdo a una realización de la invención, las combinaciones de antígenos o proteínas de fusión que contienen una porción o porciones de los antígenos incluirán GBS 80 o una porción de la misma en combinación con de uno a 10 antígenos, preferentemente de uno a 10 o menos antígenos. Se pueden encontrar ejemplos de antígenos GBS en las solicitudes internacionales de los Estados Unidos con número de serie 10/415.182, presentada el 28 de abril de 2003, (WO04/041157 y WO05/028618) y WO04/099242.

Polisacáridos de GBS

Las composiciones de la invención se pueden mejorar adicionalmente incluyendo polisacáridos de GBS. Preferentemente, el confórmero F de GBS80 y el sacárido contribuyen cada uno a la respuesta inmunológica en un receptor. La combinación es particularmente ventajosa cuando el sacárido y el confórmero F de GBS80 proporcionan una protección de diferentes serotipos de GBS.

Los antígenos combinados pueden estar presentes como una simple combinación en la que el antígeno sacarídico separado y el confórmero se administran juntos, o pueden estar presentes como una combinación conjugada, en la que los antígenos sacarídico y polipeptídico están unidos covalentemente entre sí.

35 Por tanto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende (i) uno o más de confórmero F de GBS 80 y (ii) uno o más de antígenos sacarídicos de GBS. El polipéptido y el polisacárido pueden estar unidos covalentemente de forma ventajosa entre sí para formar un conjugado.

En otra realización, las adhesinas de la invención puede estar conjugadas con uno o más polisacáridos, tales como los derivados de los serotipos de GBS Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII y VIII.

40 Entre ellos, los antígenos polipeptídico y sacarídico combinados cubren preferentemente (o proporcionan protección de) dos o más serotipos de GBS (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más serotipos). Los serotipos de los antígenos polipeptídico y sacarídico se pueden solapar o no. Por ejemplo, el polipéptido puede proteger frente al serogrupo II o V, mientras que el sacárido protege frente a los serogrupos Ia, Ib o bien III. Las combinaciones preferidas protegen frente a los siguientes grupos de serotipos: (1) serotipos Ia y Ib, (2) serotipos Ia y II, (3) serotipos Ia y III, (4) serotipos Ia y IV, (5) serotipos Ia y V, (6) serotipos Ia y VI, (7) serotipos Ia y VII, (8) serotipos Ia y VIII, (9) serotipos Ib y II, (10) serotipos Ib y III, (11) serotipos Ib y IV, (12) serotipos Ib y V, (13) serotipos Ib y VI, (14) serotipos Ib y VII, (15) serotipos Ib y VIII, (16) serotipos II y m, (17) serotipos II y IV, (18) serotipos II y V; (19) serotipos II y VI, (20) serotipos II y III, (21) serotipos II y VII, (22) serotipos III y IV, (23) serotipos III y V, (24) serotipos III y VI, (25) serotipos III y VII, (26) serotipos III y VIII, (27) serotipos IV y V, (28) serotipos IV y VI, (29) serotipos IV y VII, (30) serotipos IV y VIII, (31) serotipos V y VI, (32) serotipos V y VII, (33) serotipos V y VIII, (34) serotipos VI y VII, (35) serotipos VI y VIII, y (36) serotipos VII y VIII.

50 Aún más preferentemente, las combinaciones protegen frente a los siguientes grupos de serotipos: (1) serotipos Ia y II, (2) serotipos Ia y V, (3) serotipos Ib y II, (4) serotipos Ib y V, (5) serotipos III y II, y (6) serotipos III y V. Lo más preferentemente, las combinaciones protegen frente a los serotipos III y V. La protección frente a los serotipos II y V se proporciona preferentemente por antígenos polipeptídicos.

La protección frente a los serotipos Ia, Ib y/o III puede ser antígenos polipeptídicos o sacarídicos.

55 En una realización, la composición inmunogénica del confórmero F comprende un antígeno sacarídico de GBS y al

5 menos dos antígenos polipeptídicos de GBS o fragmentos de los mismos, en la que dicho antígeno sacarídico de GBS comprende un sacárido seleccionado del serotipo de GBS Ia, Ib, y III, y en la que dichos antígenos polipeptídicos de GBS comprenden una combinación de al menos dos polipéptidos o un fragmento del mismo seleccionados del grupo de antígenos que consiste en GBS 80 (gi:2253618), GBS 67 (gi:22537555), SAN1518 (Spb1, gi:77408651), GBS 104 y GBS 322 (el antígenos anteriores se describen en la solicitud de patente de los Estados Unidos n.º 11/192.046). Preferentemente, la combinación incluye GBS 80 o un fragmento del mismo.

Otros antígenos

Las composiciones de la invención pueden comprender además uno o más antígenos adicionales, incluyendo antígenos bacterianos, víricos o parasitarios adicionales.

10 En otra realización, los confórmeros F de GB680 de la invención se combinan con uno o más antígenos adicionales adecuados para su uso en una vacuna diseñada para proteger ancianos o individuos inmunocomprometidos. Por ejemplo, el confórmero F se puede combinar con un antígeno derivado del grupo que consiste en virus *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Legionella pneumophila*, *Listeia monocytogenes*, *Neisseria meningitides*, influenza y Parainfluenza ("PIV").

15 Cuando se usa un antígeno sacarídico, está preferentemente conjugado a una proteína transportadora con el fin de potenciar inmunogenicidad (por ejemplo, Ramsay y cols. (2001) Lancet 357(9251): 195-196; Lindberg (1999) Vaccine 17 Supl. 2: S28-36; Buttery y Moxon (2000) J R Coll Physicians Lond 34:163-168; Ahmad y Chapnick (1999) Infect Dis Clin North Am 13: 113 133, vii; Goldblatt (1998) J. Med. Microbiol. 47:563-567; documentos EP-0 477 508; US 5,306,492; WO98/42721; Conjugate Vaccines (eds. Cruse y cols.) ISBN 3805549326, en particular vol. 10:48-114; Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques ISBN: 0123423368 o 012342335X). Las proteínas transportadoras preferidas son toxinas o toxoides bacterianos, tales como toxoides de difteria o tetánico. El toxoide de difteria CRM97 es particularmente preferido (Research Disclosure, 453077 (Enero 2002)). Otros polipéptidos transportadores incluyen la proteína de la membrana externa de *N.meningitidis* (documento EP-A-0372501), péptidos sintéticos (documentos EP-A-0378881; EP-A-0427347), proteínas de choque térmico (documentos WO93/17712; WO94/03208), proteínas de tos ferina (documentos WO98/58668; EP-A-0471177), proteína D de *H.influenzae* (documento WO00/56360), citocinas (documento WO91/01146), linfocinas, hormonas, factores de crecimiento, toxina A o B de *C.difficile* (documento WO00/61761), proteínas de captación de hierro (documento WO01/72337), etc. Cuando una mezcla comprende sacáridos capsulares de ambos serogrupos A y C, se puede preferir que la proporción (p/p) de sacárido MenA:sacárido MenC es mayor de 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 10:1 o mayor). Se pueden conjugar diferentes sacáridos al mismo o a diferente tipo de proteína transportadora. Se puede usar cualquier reacción de conjugación adecuada, con cualquier enlazador adecuado cuando sea necesario.

20

25

30

Cuando sea necesario, se detoxifican los antígenos proteicos tóxicos, por ejemplo, detoxificación de toxina tos ferina por medios químicos y/o genéticos.

35 Cuando se incluye un antígeno de difteria en la composición también se prefiere incluir el antígeno de tétanos y el antígeno de tos ferina. De forma similar, cuando se incluye un antígeno de tétanos también se prefiere incluir el antígeno de difteria y el antígeno de tos ferina. De forma similar, cuando se incluye un antígeno de tos ferina también se prefiere incluir el antígeno de difteria y el antígeno de tétanos.

40 Los antígenos en la composición estarán presentes normalmente en una concentración de al menos 1 µg/ml cada uno. En general, la concentración de cualquier antígeno dado será suficiente para facilitar una respuesta inmunitaria frente a ese antígeno.

45 Como alternativa al uso de antígenos proteicos en la composición de la invención, se puede usar ácido nucleico que codifique el antígeno (por ejemplo, Robinson y Torres (1997) Seminars in Immunology 9:271-283; Donnelly y cols. (1997) Annu Rev Immunol 15:617-648; Scott-Taylor y Dalgleish (2000) Expert Opin Investig Drugs 9:471-480; Apostolopoulos y Plebanski (2000) Curr Opin Mol. Ther 2:441-447; Ilan (1999) Curr Opin Mol. Ther 1:116-120; Dubensky y cols. (2000) Mol. Med 6: 723-732; Robinson y Pertmer (2000) Adv Virus Res 55: 1-74; Donnelly y cols. (2000) Am J Respir Crit Care Med 162(4 Pt 2):S190-193; Davis (1999) Mt. Sinai J. Med. 66:84-90). Los componentes de proteína de las composiciones de la invención se pueden reemplazar así por ácido nucleico (preferentemente ADN, por ejemplo, en forma de un plásmido) que codifica la proteína.

Vacunas

50 Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir, para evitar la infección) o bien terapéuticas (es decir, para tratar la enfermedad después de la infección).

55 Estas vacunas comprenden el confórmero F de GBS80, normalmente en combinación con "vehículos farmacéuticamente aceptables", que incluyen cualquier vehículo que por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición. Los vehículos adecuados son macromoléculas normalmente grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, agregados de lípidos (tales como gotas de

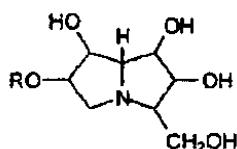
aceite o lisosomas) y partículas víricas inactivas. Tales vehículos son muy conocidos por los expertos en la técnica. Adicionalmente, estos vehículos pueden funcionar como agentes inmunoestimulantes ("coadyuvantes"). Además, el confórmero F de la adhesina bacteriana se puede conjugar a un toxoide bacteriano, tal como un toxoide de tales patógenos como difteria, tétanos, cólera, *H. pylori*, etc.

- 5 Las composiciones tales como vacunas y composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir ventajosamente un coadyuvante, que puede funcionar para potenciar las respuestas inmunitarias (humoral y/o celular) provocadas en un paciente que recibe la composición.

Los coadyuvantes que se pueden usar con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una composición que contiene mineral, incluyendo sales de calcio y sales de aluminio (o mezclas de las mismas).
- 10 Las sales de calcio incluyen fosfato de calcio (por ejemplo, las partículas "CAP" dadas a conocer en el documento US 6.355.271). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, etc., tomando las sales cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, etc.). Se prefiere la adsorción de estas sales. Las composiciones que contienen mineral también se pueden formular como una partícula de sal metálica (documento WO00/23105). Los coadyuvantes de sales de aluminio se describen con más detalle a continuación.
- 15 • Agentes inductores de citocina (véase con más detalle a continuación).
- Saponinas (capítulo 22 de Diseño de la vacuna: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)), que son un grupo heterólogo de esterol glucósidos y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia variedad de especies de plantas. La saponina de la corteza del árbol *Quillaia saponaria* Molina ha sido ampliamente estudiada como
- 20 coadyuvante. La saponina también se puede obtener comercialmente de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de novia) y *Saponaria officianalis* (hierba jabonera). Las formulaciones de coadyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones de lípidos, tales como ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™. Las composiciones de saponina se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado fracciones purificadas específicas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A,
- 25 QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se da a conocer en el documento US 5.057.540). Es posible usar una fracción A de Quil A junto con al menos algún otro coadyuvante (documento WO05/02620). Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esterol, tal como colesterol (documento WO96/33739). Se pueden usar las combinaciones de saponinas y colesterol para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (capítulo 23 de Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). Normalmente, los ISCOM también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Se puede usar cualquier saponina conocida en los ISCOM. Preferentemente, los ISCOM incluyen uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen además en los documentos EP-A-0109942, US 4.578.269, WO96/11711 y US 6.352.697. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional (documentos WO00/07621; US
- 30 6.506.386). Es posible usar una mezcla de al menos dos complejos ISCOM, comprendiendo cada complejo esencialmente una fracción de saponina, en la que los complejos son complejos ISCOM o complejos de matriz ISCOM (documento WO04/04762). Se puede encontrar una revisión del desarrollo de coadyuvantes basados en saponina en Barr y cols. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:247-271 y Sjolanderet y cols. (1998) *Advanced Drug Delivery Reviews* 32:321-338.
- 35
- Coadyuvantes grasos (véase con más detalle a continuación).
 - Toxinas ADP-ribosilantes bacterianas (por ejemplo, la enterotoxina termolábil de *E. coli* "LT", toxina de cólera "CT", o toxina de tos ferina "PT") y derivados detoxificados de las mismas, tales como las toxinas mutantes conocidas como LT-K63 y LT R72 (Pizza y cols. (2000) *Int J Med Microbiol* 290:455-461). El uso de toxinas ADP-ribosilantes detoxificadas como coadyuvantes mucosales se describe en el documento WO95/17211 y como coadyuvantes
- 40 parenterales en el documento WO98/42375.
- Bioadhesivos y mucoadhesivos, tales como ácido hialurónico esterificado y microesferas (Singh y cols. (2001) *J Cont Release* 70:267-276) o quitosán y sus derivados (documentos WO99/27960).
 - Micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 µm de diámetro, más preferentemente de ~200 nm a ~30 µm de diámetro, o de ~500 nm a ~10 µm de diámetro) formadas de materiales que son biodegradables y no
- 45 tóxicos (por ejemplo, un poli(α-hidroxiácido), un ácido polihidroxibutírico, un poliortoéster, un polianhídrido, un policaprolactona, etc.), siendo preferido el poli(láctido-co-glicólido), tratados opcionalmente para tener una superficie cargada negativamente (por ejemplo, con SDS) o una superficie cargada positivamente (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).
- Liposomas (Capítulos 13 & 14 de Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). Los ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para su uso como coadyuvantes se describen en los documentos US 6.090.406, US 5.916.588, y EP-A-0626169.
- 50
- 55

- Emulsiones de aceite en agua (véase con más detalle a continuación).
- Éteres de polioxietileno y ésteres de polioxietileno (documento WO99/52549). Tales formulaciones • incluyen además tensioactivos de éster de polioxietilensorbitán en combinación con un octoxinol (documento WO01/21207) así como tensioactivos de alquil éteres de polioxietileno o ésteres en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol (documento WO01/21152). Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan del siguiente grupo: polioxietilen-9-lauril éter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoril éter, polioxietilen-8-esteoril éter, polioxietilen-4-lauril éter, polioxietilen-35-lauril éter, y polioxietilen-23-lauril éter.
- Los péptidos de muramilo, tales como N-acetilmuramil-L-treonil-D-isoglutamina ("tr-MDP"), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), N-acetilglucosaminil-N-acetilmuramil-L-Al-D-isoglu-L-Ala-dipalmitoilo propilamida ("DTP-DPP", o "teramida™"), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoilo-sn-glicero-3-hidroxi-fosforilo)-etilamina ("MTP-PE").
- Una preparación de proteosoma de proteínas de membrana externa preparada de una primera bacteria Gram-negativa en combinación con una preparación de liposacáridos derivada de fuentes de una segunda bacteria Gram negativa, en la que las preparaciones de liposacáridos y proteosoma de proteínas de membrana externa forman un complejo de coadyuvante no covalente estable. Tales complejos incluyen "IVX-908", un complejo que comprende membrana externa de *Neisseria meningitidis* y lipopolisacáridos. Éstos se han usado como coadyuvantes para vacunas de influenza (documento WO02/72012).
- Metil-inosina 5'-monofosfato ("MIMP") (Signorelli y Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3(8):1177-86).
- Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilado (documento WO04/64715), tal como uno que tiene la fórmula:



en la que R se selecciona del grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alquenilo, alquinilo y arilo lineales o ramificados, sustituidos o no sustituidos, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de la misma. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarina-6- α -D-glucopiranososa, 3 epi casuarina, 7 epi casuarina, 3,7 diepi casuarina, etc.

- Una gamma inulina (Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6:559-80) o derivado de la misma, tal como algamulina.
- Un ligando CD1d, tal como un α glicosilceramida, por ejemplo, α -galactosilceramida.

Estas y otras sustancias activas coadyuvantes se debaten con más detalle en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) y *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volumen 42 de *Methods in Molecular Methods* series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.

Las composiciones pueden incluir dos o más de dichos coadyuvantes. Por ejemplo, pueden incluir ventajosamente tanto una emulsión de aceite en agua como un agente de inducción de citocina, ya que esta combinación mejora las respuestas de citocina provocadas por las vacunas de influenza, tales como la respuesta del interferón γ , teniendo una mejora mucho mayor que la observada cuando la emulsión o bien el agente se usan solos.

Normalmente, los antígenos y coadyuvantes en una composición estarán en una mezcla.

Cuando una vacuna incluye un coadyuvante, se puede preparar extemporáneamente, en el momento de la administración. Por tanto, la invención proporciona kits que incluyen los componentes de antígeno y coadyuvante listos para mezclar. El kit permite que el adyuvante y el antígeno se mantengan separados hasta el momento de su uso. Los componentes están separados físicamente entre sí dentro del kit, y esta separación se puede lograr de distintas formas. Por ejemplo, los dos componentes pueden estar en dos recipientes separados, tales como viales. Después se puede mezclar el contenido de los dos viales, por ejemplo, retirando el contenido de un vial y añadiéndolo al otro vial, o por separado retirando el contenido de ambos viales y mezclándolos en un tercer recipiente. En una disposición preferida, uno de los componentes del kit está en una jeringa y el otro está en un recipiente, tal como un vial. Se puede usar la jeringa (por ejemplo, con una aguja) para insertar su contenido en el segundo recipiente para la mezcla, y después se puede retirar la mezcla en la jeringa. Después, el contenido mezclado de la jeringa se puede administrar a un paciente, normalmente a través de una nueva aguja estéril. El envasado de un componente en una jeringa elimina la necesidad de usar una jeringa separada para la administración al paciente. En otra disposición preferida, los dos componentes del kit se almacenan juntos pero de forma separada en la misma jeringa, por ejemplo, una jeringa de

doble cámara, tal como la dada a conocer en los documentos WO05/89837, US 6.692.468, WO00/07647, WO99/17820, US 5.971.953, 4.060.082, EP-A-0520618 y WO98/01174. Cuando la jeringa se acciona (por ejemplo, durante la administración a un paciente), entonces se mezcla el contenido de las dos cámaras. Esta disposición evita la necesidad de una etapa de mezclado separado en el momento de su uso.

5 **Coadyuvantes de emulsión de aceite en agua**

Se ha encontrado que las emulsiones de aceite en agua son particularmente adecuadas para su uso en vacunas de virus de influenza coadyuvantes. Se conocen diferentes emulsiones de este tipo, y normalmente incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el/los aceite(s) y el/los tensioactivo(s) biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotas de aceite en la emulsión generalmente son menores de 5 µm de diámetro, e incluso pueden tener un diámetro de submicrones, lográndose estos pequeños tamaños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren las gotas con un tamaño de menos de 220 nm ya que se pueden someter a esterilización por filtración.

Se puede usar la invención con aceites tales como los de origen animal (tal como un pez) o vegetal. Las fuentes de aceites vegetales incluyen frutos secos, semillas y granos. El aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de coco y aceite de oliva, los más comúnmente disponibles, ejemplifican los aceites de frutos secos. Se puede usar aceite de jojoba, por ejemplo, obtenido del grano de jojoba. Los aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo del grano, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, pero también se puede usar el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, tef, triticual y similares. Los ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, mientras no se produzcan de forma natural en aceites de semilla, se pueden preparar por hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados comenzando por los aceites de frutos secos y de semilla. Las grasas y los aceites de leche de mamífero son metabolizables y por lo tanto, se pueden usar en la práctica de esta invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes de origen animal son muy conocidos en la técnica. La mayoría de los peces contienen aceites metabolizables que se pueden absorber fácilmente. Por ejemplo, el aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón y aceite de ballena, tales como el esperma de ballena, ejemplifican varios de los aceites de peces que se pueden usar en el presente documento. Varios aceites de cadena ramificada se sintetizan bioquímicamente en unidades de isopreno de 5-carbonos y en general se denominan terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene un terpenoide insaturado, ramificado, conocido como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que es particularmente preferido en el presente documento. El escualano, análogo saturado de escualeno, también es un aceite preferido. Los aceites de peces, incluyendo escualeno y escualano, están fácilmente disponibles de fuentes comerciales o se pueden obtener por procedimientos conocidos en la técnica. Otros aceites preferidos con los tocoferoles (véase a continuación). Se pueden usar mezclas de aceites.

Los tensioactivos se pueden clasificar por su "HLB" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferidos de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferentemente de al menos 15, y más preferentemente de al menos 16. Se puede usar la invención con tensioactivos incluyendo, pero sin limitarse a: tensioactivos de ésteres de polioxietilensorbitán (denominados comúnmente Tweens), especialmente polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/o óxido de butileno (BO), vendidos bajo el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros de bloque EO/PO lineales; octoxinoles, que pueden variar en el número de repeticiones de los grupos etoxi (oxi-1,2-etanodil), siendo octoxinol-9 (Triton X 100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) de interés particular; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); éteres grasos de polioxietileno derivados de alcoholes laurilo, cetilo, estearilo y oleilo (conocidos como tensioactivos Brij), tales como trietilenglicol monolauril éter (Brij 30); y ésteres de sorbitán (comúnmente conocidos como SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Los tensioactivos preferidos para incluir en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitán) Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Tritón X 100. se pueden usar mezclas de tensioactivos, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85.

Los coadyuvantes de emulsión de aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- Una emulsión en submicrones de escualeno, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente un 5% de escualeno, de aproximadamente un 0,5% de polisorbato 80 y de aproximadamente un 0,5% de Span 85. En términos de peso, estas proporciones se convierten en un 4,3% de escualeno, un 0,5% de polisorbato 80 y un 0,48% de Span 85. Este coadyuvante se conoce como "MF59" (documento WO90/14837; Podda y Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2:197-203; Podda (2001) Vaccine 19:2673-2680), como se describe con más detalle en el capítulo 10 de Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell & Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X) y en el capítulo 12 de Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de Methods in Molecular Methods series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan. La emulsión de MF59 incluye ventajosamente iones citrato, por ejemplo, tampón de citrato de sodio 10 mM.
- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener desde un 2 hasta un 10% de escualeno, desde un 2 hasta un 10% de tocoferol y desde un 0,3 hasta un 3% de Tween 80, y la

proporción en peso de escualeno:tocoferol es preferentemente <1 ya que esto proporciona una emulsión más estable. Una emulsión de este tipo se puede preparar disolviendo Tween 80 en PBS para dar una solución al 2%, mezclando después 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL α tocoferol y 5 ml de escualeno), después microfuidizando la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotas de aceite de submicrones, por ejemplo, con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente de aproximadamente 180 nm.

- Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente Triton (por ejemplo, Triton X-100).
- Una emulsión de escualano, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). Se puede formular la emulsión en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para los dipéptidos de muramilo, y se ha usado con treonil MDP en el coadyuvante "SAF 1" (Allison y Byars (1992) Res Immunol 143:519-25) (0,05-1% de Tr-MDP, 5% de escualano, 2,5% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). También se puede usar sin el Tr-MDP, como en el coadyuvante "AF" (Hariharan y cols. (1995) Cancer Res 55:3486-9) (5% de escualano, 1,25% de Pluronic L121 y 0,2% de polisorbato 80). Se prefiere la microfuidización.
- Una emulsión que tiene desde 0,5 50% de un aceite, 0,1 10% de un fosfolípido y 0,05 5% de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia WO95/11700, los componentes fosfolípidos preferidos son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, esfingomielina y cardiolipina. Los tamaños de gota de submicrones son ventajosos.
- Una emulsión aceite en agua en submicrones de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Se pueden incluir aditivos, tales como QuilA saponina, colesterol, un conjugado de saponina-lipofilo (tal como GPI-0100, descrito en el documento US 6.080.725, producido por adición de amina alifática a desacilsaponina por medio del grupo carboxilo de ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis (2-hidroxiethyl)propanodiamina.
- Una emulsión en la que se asocian una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esterol (por ejemplo, un colesterol) como micelas helicoidales (documento WO05/097181).

Las emulsiones se pueden mezclar con antígeno extemporáneamente, en el momento de la administración. Por tanto, el adyuvante y el antígeno se pueden mantener separadamente en una vacuna envasada o distribuida, lista para una formulación final en el momento de su uso. En general, el antígeno estará en forma acuosa, de modo que la vacuna se prepara finalmente mezclando los dos líquidos. La proporción en volumen de los dos líquidos para la mezcla puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5) pero en general es de 1:1.

Después de que se hayan mezclado el antígeno y el coadyuvante, en general el antígeno permanecerá en solución acuosa, pero se puede distribuir solo alrededor de la interfase aceite/agua. En general, poco o nada de antígeno entrará en la fase de aceite de la emulsión.

Cuando una composición incluye un tocoferol, se puede usar cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ζ , pero se prefieren los α tocoferoles. El tocoferol puede tomar diversas formas, por ejemplo, diferentes sales y/o isómeros. Las sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. Se pueden usar tanto D α tocoferol como DL α tocoferol. Los tocoferoles se incluyen ventajosamente en vacunas para su uso en pacientes ancianos (por ejemplo, de 60 años de edad o mayores) ya que se ha comunicado que la vitamina E tiene un efecto positivo sobre la respuesta inmunitaria en este grupo de pacientes (Han y cols. (2005) Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, París, 9-10 de junio de 2005). También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones (documento US 6.630.161). Un α tocoferol preferido es DL α tocoferol, y la sal preferida de este tocoferol es el succinato. Se ha encontrado que la sal de succinato coopera con los ligandos relacionados con TNF *in vivo*. Además, el α tocoferol succinato se conoce por ser compatible con vacunas (por ejemplo, vacunas de influenza) y por ser un conservante útil como alternativa a compuestos de mercurio (documento WO02/097072).

Agentes inductores de citocinas

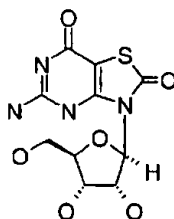
Los agentes inductores de citocinas para su inclusión en composiciones de la invención, cuando se administran a un paciente, pueden provocar que el sistema inmunitario libere citocinas, incluyendo interferones e interleucinas. Se sabe que las respuestas de citocinas están implicadas en las fases temprana y decisiva de la defensa del huésped frente a una infección por patógenos (Hayden y cols. (1998) J Clin Invest 101 (3):643-9). Los agentes preferidos pueden provocar la liberación de uno o más de: interferón γ ; interleucina 1; interleucina 2; interleucina 12; TNF α ; TNF B y GM CSF. Los agentes preferidos provocan la liberación de citocinas asociadas con una respuesta inmunitaria de tipo Th1, por ejemplo, interferón γ , TNF α , interleucina 2. Se prefiere la estimulación tanto de interferón γ como de interleucina 2.

Por lo tanto, como resultado de recibir una composición de la invención, un paciente tendrá linfocitos T que, cuando se estimulan con un antígeno, liberarán la(s) citocina(s) deseada(s) de forma específica de antígeno. Por ejemplo, los linfocitos T purificados a partir de su sangre liberarán interferón γ cuando se exponen *in vitro* al antígeno estimulado.

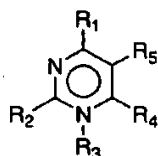
En la técnica se conocen procedimientos para medir estas respuestas en células mononucleares de sangre periférica (PBMC), e incluyen ELISA, ELISPOT, citometría de flujo y PCR en tiempo real. Por ejemplo, Tassignon y cols. (2005) *J Immunol Meth* 305:188-98 comunica un estudio en el que se monitorizaron las respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T específicos de antígeno frente al toxoide del tétanos, específicamente respuestas de interferón γ , y se encontró que ELISPOT fue el procedimiento más sensible para discriminar respuestas inducidas por TT específicas de antígeno a partir de respuestas espontáneas, pero que la detección de citocina intracitoplásmica por citometría de flujo fue el procedimiento más eficaz para detectar efectos re-estimulantes.

Los agentes inductores de citocinas adecuados incluyen, pero no se limitan a:

- 10 • Un oligonucleótido inmunoestimulador, tal como uno que contiene un resto CpG (una secuencia dinucleotídica que contiene una citosina no metilada unida por un enlace de fosfato a una guanosina), o un ARN bicatenario, o un oligonucleótido que contiene una secuencia palindrómica, o un oligonucleótido que contiene una secuencia poli(dG).
- 15 • Monofosforil-lípido A 3-O-desacilado ("33dMPL", también conocido como "MPL™") (Myers y cols. (1990) páginas 145-156 de *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*; Ulrich (2000) capítulo 16 (páginas 273-282) de *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volumen 42 de *Methods in Molecular Methods series*). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan; Johnson y cols. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9; Baldrick y cols. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413).
- 20 • Un compuesto de imidazoquinolina, tal como Imiquimod ("R 837") (documentos US 4.680.338; US 4.988.815), Resiquimod ("R 848") (documento WO92/15582), y sus análogos; y sales de los mismos (por ejemplo, las sales de clorhidrato). Se pueden encontrar otros detalles sobre imidazoquinolinas inmunoestimuladoras en Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27:571-577, Wu y cols. (2004) *Antiviral Res.* 64(2):79-83, Vasilakos y cols. (2000) *Cell Immunol.* 204(1):64-74, documentos US 4.689.338, US 4.929.624, US 5.238.944, US 5.266.575, US 5.268.376, US 5.346.905, US 5.352.784, US 5.389.640, US 5.395.937, US 5.482.936, US 5.494.916, US 5.525.612, US 6.083.505, US 6.440.992, US 6.627.640, US 6.656.938, US 6.660.735, US 6.660.747, US 6.664.260, US 6.664.264, US 6.664.265, US 6.667.312, US 6.670.372, US 6.677.347, US 6.677.348, US 6.677.349, US 6.683.088, US 6.703.402, US 6.743.920, US 6.800.624, US 6.809.203, US 6.888.000, US 6.924.293 y Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4:214-218.
- 25 • Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como los dados a conocer en el documento WO2004/060308. Los procedimientos de formulación, fabricación y rastreo para compuestos activos también se describen en el documento WO2004/060308. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tales como TNF- α .
- 30 • Un compuesto de triptantrina, tal como los dados a conocer en el documento WO2004/064759. Los procedimientos de formulación, fabricación y rastreo para compuestos activos también se describen en el documento WO2004/064759. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citocinas, tales como TNF- α .
- 35 • Un análogo de nucleósido, tal como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



y profármacos de la misma; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos dados a conocer en los documentos US 6.924.271, US 2005/0070556 y US 5.658.731; (f) un compuesto que tiene la fórmula:

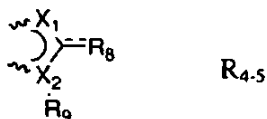


40 en la que:

R1 y R2 son cada uno independientemente, H, halo, -NRaRb, -OH, alcoxi C1-6, alcoxi C1-6 sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido, arilo C6-10, arilo C6-10 sustituido, alquilo C1-6 o alquilo C1-6 sustituido;

R3 está ausente, H, alquilo C1-6, alquilo C1-6 sustituido, arilo C6-10, arilo C6-10 sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;

- 5 R4 y R5 son cada uno independientemente, H, halo, heterociclilo, heterociclilo sustituido, C(O)-Rd, alquilo C1-6, alquilo C1-6 sustituido o enlazados juntos para formar un anillo de 5 miembros como en R4-5:

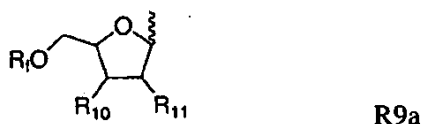


lográndose la unión en los enlaces indicados por un

X1 y X2 son cada uno independientemente, N, C, O o S;

- 10 R8 es H, halo, -OH, alquilo C1-6, alqueno C2-6, alquino C2-6, -OH, -NRaRb, -(CH₂)_n-O-Rc, -O-(alquilo C1-6), -S(O)_pRe o -C(O)-Rd;

R9 es H, alquilo C1-6, alquilo C1-6 sustituido, heterociclilo, heterociclilo sustituido o R9a, en la que R9a es:



lográndose la unión en el enlace indicados por un

- 15 R10 y R11 son cada uno independientemente, H, halo, alcoxi C1-6, alcoxi C1-6 sustituido, -NRaRb o -OH;
- cada Ra y Rb es independientemente, H, alquilo C1-6, alquilo C1-6 sustituido, -C(O)Rd, arilo C6-10;
- cada Rc es independientemente, H, fosfato, difosfato, trifosfato, alquilo C1-6 o alquilo C1-6 sustituido;
- cada Rd es independientemente, H, halo, alquilo C1-6, alquilo C1-6 sustituido, alcoxi C1-6, alcoxi C1-6 sustituido, -NH₂, -NH(alquilo C1-6), -NH (alquilo C1-6 sustituido), -N(alquilo C1-6)₂, -N(alquilo C1-6 sustituido)₂, arilo C6-10 o heterociclilo;
- 20 cada Re es independientemente H, alquilo C1-6, alquilo C1-6 sustituido, arilo C6-10, arilo C6-10 sustituido, heterociclilo o heterociclilo sustituido;
- cada Rf es independientemente, H, alquilo C1-6, alquilo C1-6 sustituido, -C(O)Rd, fosfato, difosfato o trifosfato;
- cada n es independientemente 0, 1, 2 ó 3;
- 25 cada p es independientemente 0, 1 ó 2; o
- o (g) una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de (a) a (f), un tautómero de cualquiera de (a) a (f), o una sal farmacéuticamente aceptable del tautómero.

- Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) (documento US 5.011.828).
 - Compuestos dados a conocer en el documento WO2004/87153, incluyendo: Compuestos de acilpiperazina, compuestos de indoldiona, compuestos de tetrahidraisoquinolina (THIQ) , compuestos de benzociclodiona, compuestos de aminoazavinilo, compuestos de aminobencimidazol quinolinona (ABIQ) (documentos US 6.605.617; WO02/18383), compuestos de hidroftalamida, compuestos de benzofenona, compuestos de isoxazol, compuestos de esterol, compuestos de quinazolinona, compuestos de pirrol (documento WO20041018455), compuestos de antraquinona, compuestos de quinoxalina, compuestos de triazina, compuestos de pirazalopirimidina y compuestos de benzazol (documento WO03/082272).
 - Compuestos dados a conocer en el documento PCT/US2005/022769.
- 30
- 35

- Un derivado de fosfato de aminoalquil glucosaminida, tal como RC 529 (Johnson y cols. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9:2273-2278; Evans y cols. (2003) Expert Rev Vaccines 2:219-229).
 - Un fosfaceno, tal como poli(di(carboxilatofenoxi)fosfaceno) ("PCPP") como se describe, por ejemplo, por Andrianov y cols. (1998) Biomaterials 19:109-115 and Payne y cols. (1998) Adv Drug Delivery Review 31:185-196.
- 5 • Inmunopotenciadores de moléculas pequeñas (SMIP), tales como:
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- N2-etil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- 10 1-(2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- N2-butil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-pentil-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N2-prop-2-enil-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- 15 1-(2-metilpropil)-2-((fenilmetil)tio)-1H-imidazo(4,5-c)quinolin-4-amina
- 1-(2-metilpropil)-2-(propiltio)-1H-imidazo(4,5-c)quinolin-4-amina
- 2-((4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolin-2-il)(metil)amino)etanol
- acetato de 2-((4-amino-1-(2-metilpropil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolin-2-il)(metil)amino)etilo
- 4-amino-1-(2-metilpropil)-1,3-dihidro-2H-imidazo(4,5-c)quinolin-2-ona
- 20 N2-butil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- N2-butil-N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- N2-metil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- N2,N2-dimetil-1-(2-metilpropil)-N4,N4-bis(fenilmetil)-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina
- 1-{4-amino-2-(metil(propil)amino)-1H-imidazo(4,5-c)quinolin-1-il}-2-metilpropan-2-ol
- 25 1-(4-amino-2-(propilamino)-1H-imidazo(4,5-c)quinolin-1-il)-2-metilpropan-2-ol
- N4,N4-dibencil-1-(2-metoxi-2-metilpropil)-N2-propil-1H-imidazo(4,5-c)quinolina-2,4-diamina.

Los agentes inductores de citocinas para su uso en la presente invención pueden ser moduladores y/o agonistas de receptores de tipo Toll (TLR). Por ejemplo, pueden ser agonistas de uno o más de las proteínas TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y/o TLR9 humanas. Los agentes preferidos de agonistas de TLR7 (por ejemplo, imidazoquinolinas) y/o TLR9 (por ejemplo, oligonucleótidos CpG). Estos agentes son útiles para inactivar las vías de inmunidad innatas.

El agente inductor de citocinas se puede añadir a la composición en distintas fases durante su producción. Por ejemplo, puede estar dentro de una composición de antígeno, y después se puede añadir esta mezcla a una emulsión de aceite en agua. Como alternativa, puede estar dentro de una emulsión de aceite en agua, caso en el que el agente se puede añadir a los componentes de la emulsión antes de la emulsificación o bien se puede añadir a la emulsión después de la emulsificación. De forma similar, se puede coacervar el agente dentro de gotas de emulsión. La ubicación y la distribución del agente inductor de citocinas dentro de la composición final dependerá de sus propiedades hidrófilas/lipófilas, por ejemplo, se puede ubicar el agente en la fase acuosa, en la fase de aceite y/o en la interfase aceite agua.

Se puede conjugar el agente inductor de citocinas con un agente separado, tal como un antígeno (por ejemplo, CRM197). Se proporciona una revisión general de técnicas de conjugación para moléculas pequeñas por Thompson y cols. (2003) Methods in Molecular Medicine 94:255-266. Como alternativa, los coadyuvantes puede estar asociados de forma no covalente con otros agentes, tales como por medio de interacciones hidrófobas o iónicas.

Dos agentes inductores de citocinas preferidos son (a) oligonucleótidos inmunoestimuladores y (b) 3dMPL.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores puede incluir modificaciones de nucleótidos/análogos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser bicatenarios o (excepto el ARN) monocatenarios. Kandimalla y cols. (2003) *Nucleic Acids Research* 31:2393-2400, los documentos WO02/26757 y WO99/62923 dan a conocer posibles sustituciones de análogos, por ejemplo, el reemplazo de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto coadyuvante de oligonucleótidos CpG es analizado además por Krieg (2003) *Nature Medicine* 9:831-835, McCluskie y cols. (2002) *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 32:179-185, documentos WO98/401 US 6.207.646, US 6.239.116 y US 6.429.199. Se puede dirigir una secuencia CpG para TLR9, tal como el resto GTCGTT o TTCGTT (Kandimalla y cols. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3):654-658). La secuencia CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmunitaria de Th1, tal como un ODN CpG-A (oligodesoxinucleótido), o puede ser más específica para inducir una respuesta de células B, tales un ODN CpG-B. Los ODN CpG-A y CpG-B se debaten por Blackwell y cols. (2003) *J Immunol* 170:4061-4068, Krieg (2002) *Trends Immunol* 23:64-65 y en el documento WO01/95935. Preferentemente, el CpG es un ODN CpG-A. Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de modo que el extremo 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG se pueden unir a sus extremos 3' para formar "inmunómeros". Véase, por ejemplo, Kandimalla y cols. (2003) *Biochemical Society Transactions* 31 (parte 3):654-658, Kandimalla y cols. (2003) *BBRC* 306:948-953, Bhagat y cols. (2003) *BBRC* 300:853-861 y el documento WO03/035836. Un coadyuvante de CpG útil es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.).

Como alternativa, o además, al uso de secuencias de CpG, se pueden usar secuencias TpG (documento WO01/22972). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de restos de CpG no metilados.

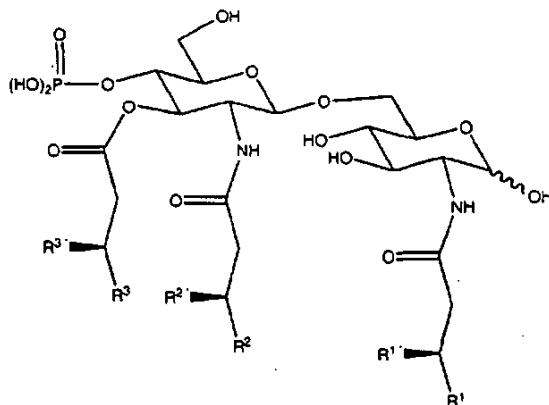
El oligonucleótido inmunoestimulador puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT, como se da a conocer en el documento WO01/22972), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25% en timidina (por ejemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etc.). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo, CCCC, como se da a conocer en el documento WO2004/87153), y/o puede tener una composición de nucleótidos con >25% en citosina (por ejemplo, >35%, >40%, >50%, >60%, >80%, etc.). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de restos de CpG no metilados.

Los oligonucleótidos inmunoestimuladores comprenderán normalmente al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

El 3dMPL (también conocido como monofosforil lípido A 3 des-O-acilado o 3-O-desacil-4'-monofosforil-lípido A) es un coadyuvante en el que se ha desacilado la posición 3 de la glucosamina en el extremo reductor en el monofosforil lípido A. Se ha preparado el 3dMPL a partir de un mutante sin heptosa de *Salmonella minnesota*, y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo lábil ácido y un grupo acilo lábil básico. Activa células del linaje monocito/macrófago y estimula la liberación de varias citocinas, incluyendo IL 1, IL-12, TNF α y GM-CSF (véase también Thompson y cols. (2005) J

Leukoc Biol 78: "The low-toxicity versions of LPS, MPL® adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells"). La preparación de 3dMPL se describió originalmente en el documento GB A 2220211.

El 3dMPL puede tomar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, que varía por su acilación (por ejemplo, teniendo 3, 4, 5 ó 6 cadenas acilo, que pueden ser de longitudes diferentes). Los dos monosacáridos de glucosamina (también conocidos como 2 desoxi-2-amino-glucosa) son N-acilados en las 2 posiciones de carbono (es decir, en las posiciones 2 y 2'), y también hay O-acilación en la posición 3'. El grupo unido al carbono 2 tiene la fórmula -NH-CO-CH₂-CR₁R₁'. El grupo unido al carbono 2' tiene la fórmula -NH-CO-CH₂-CR₂R₂'. El grupo unido al carbono 3' tiene la fórmula -O-CO-CH₂-CR₃R₃'. Una estructura representativa es:



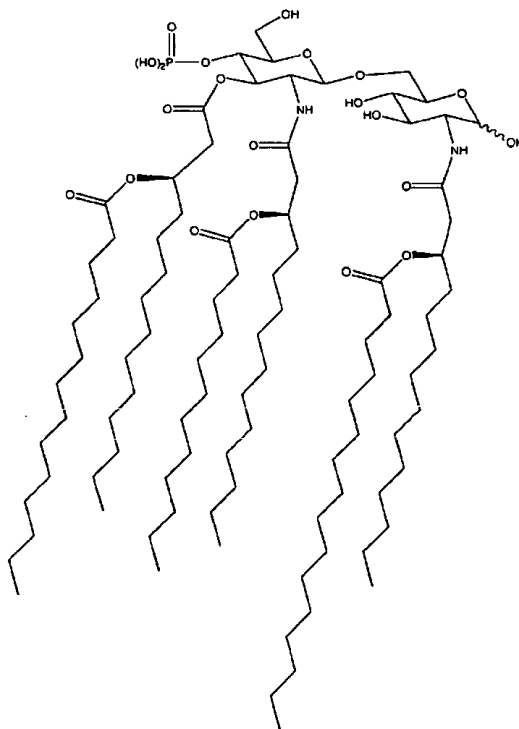
Los grupos R₁, R₂ y R₃ son cada uno independientemente -(CH₂)_n-CH₃. El valor de n está preferentemente entre 8 y

16, más preferentemente entre 9 y 12 y lo más preferentemente es 10.

Los grupos R1', R2' y R3' puede ser cada uno independientemente: (a) -H; (b) -OH; o (c) -O CO R4, en el que R4 es -H o bien -(CH2)m-CH3, en el que el valor de m está preferentemente entre 8 y 16, y más preferentemente es 10, 12 o 14. En la posición 2, m es preferentemente 14. En la posición 2' m es preferentemente 10. En la posición 3' m es preferentemente 12. Los grupos R1', R2' y R3' son, por tanto, preferentemente grupos -O-acilo de ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico o ácido hexadecanoico.

Cuando todos los R1', R2' y R3' son -H entonces el 3dMPL sólo tiene 3 cadenas acilo (una sobre cada una de las posiciones 2, 2' y 3'). Cuando sólo dos de R1', R2' y R3' son -H, entonces el 3dMPL puede tener 4 cadenas acilo. Cuando sólo uno de R1', R2' y R3' es -H, entonces el 3dMPL puede tener 5 cadenas acilo. Cuando ninguno de R1', R2' y R3' es -H, entonces el 3dMPL puede tener 6 cadenas acilo. El coadyuvante 3dMPL usado de acuerdo con la invención puede ser una mezcla de estas formas, con desde 3 hasta 6 cadenas acilo, pero se prefiere incluir 3dMPL con 6 cadenas acilo en la mezcla, y en particular para asegurarse de que la forma de cadena hexaacilo constituye al menos un 10% en peso del 3dMPL total, por ejemplo, >20%, >30%, >40%, >50% o más. Se ha encontrado que el 3dMPL con 6 cadenas acilo es la forma activa más coadyuvante.

Por tanto, la forma más preferida de 3dMPL para su inclusión en las composiciones de la invención es:



Cuando el 3dMPL se usa en forma de una mezcla, entonces las referencias a las cantidades o concentraciones de 3dMPL en las composiciones de la invención se refieren a las especies de 3dMPL combinadas en la mezcla.

En condiciones acuosas, el 3dMPL puede formar agregados micelares o partículas con tamaños diferentes, por ejemplo, con un diámetro de <150 nm o >500 nm. Se puede usar una o ambos de estos con la invención, y las mejores partículas se pueden seleccionar por ensayo rutinario. Se prefieren partículas más pequeñas (por ejemplo, suficientemente pequeñas para dar una suspensión acuosa clara de 3dMPL) para su uso de acuerdo con la invención debido a su actividad superior (documento WO 94/21292). Las partículas preferidas tienen un diámetro medio de menos de 220 nm, más preferentemente de menos de 200 nm o de menos de 150 nm o de menos de 120 nm, e incluso pueden tener un diámetro medio de menos de 100 nm. En la mayoría de los casos, sin embargo, el diámetro medio no será menor de 50 nm. Estas partículas son suficientemente pequeñas para ser adecuadas para la esterilización por filtración. Se puede evaluar el diámetro de las partículas por técnica rutinaria de dispersión de luz dinámica, lo que revela un diámetro de partícula medio. Cuando se dice que una partícula tiene un diámetro de x nm, en general será una distribución de partículas sobre esta media, pero al menos un 50% en número (por ejemplo, >60%, >70%, >80%, >90%, o más) de las partículas tendrán un diámetro dentro del intervalo de x±25%.

Se puede usar 3dMPL ventajosamente en combinación con una emulsión de aceite en agua. Sustancialmente, todo el 3dMPL se puede situar en la fase acuosa de la emulsión.

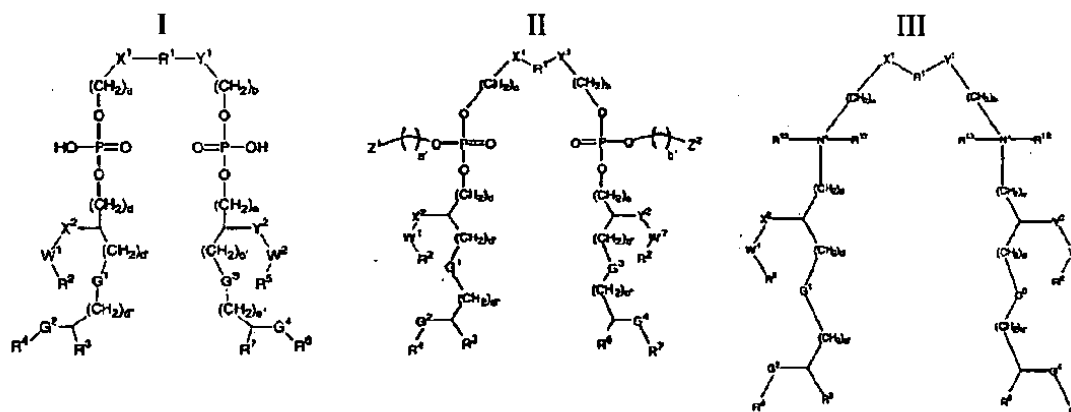
Se puede usar el 3dMPL solo, o en combinación con uno o más compuestos adicionales. Por ejemplo, es conocido el uso de 3dMPL en combinación con la saponina QS21 (documento WO94/00153) (incluyendo en una emulsión de aceite en agua (documento WO95/17210)), con un oligonucleótido inmunoestimulador, tanto con QS21 como con un oligonucleótido inmunoestimulador, con fosfato de aluminio (documento WO96/26741), con hidróxido de aluminio (documento WO93/19780) o tanto con fosfato de aluminio como con hidróxido de aluminio.

5

Coadyuvantes grasos

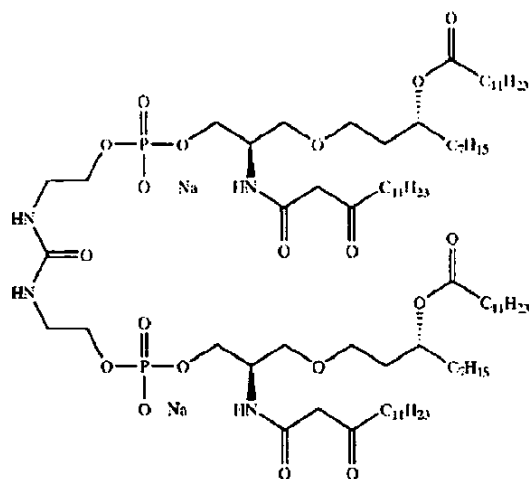
Los coadyuvantes grasos que se pueden usar con la invención incluyen las emulsiones de aceite en agua descritas anteriormente, y también incluyen, por ejemplo:

- Un compuesto de fórmula I, II o III, o una sal de los mismos:

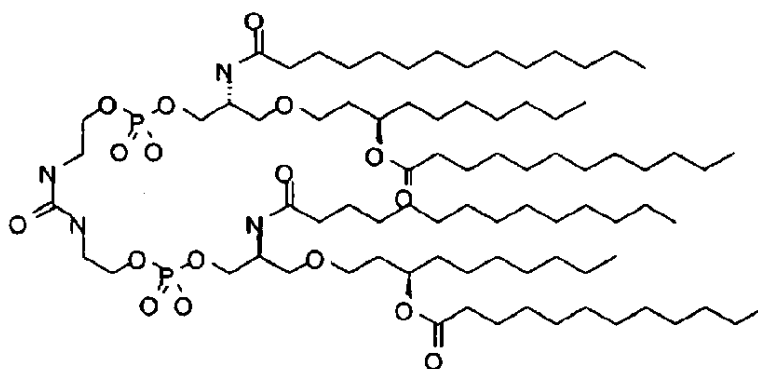


10

como se define en el documento WO03/011223, tales como "ER 803058", "ER 803732", "ER 804053", "ER 804058", "ER 804059", "ER 804442", "ER 804680", "ER 804764", "ER 803022" o "ER 804057", por ejemplo:

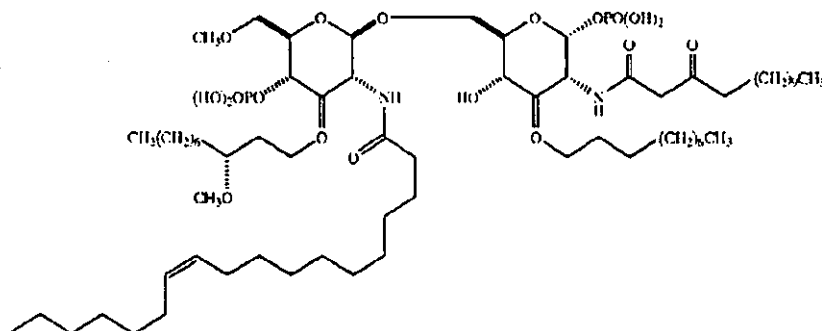


ER804057



ER 803022:

- Derivados de lípidos A de *Escherichia coli*, tales como OM-174 (descritos en Meraldi y cols. (2003) *Vaccine* 21:2485-2491 and Pajak y cols. (2003) *Vaccine* 21:836-842).
- Una formulación de un lípido catiónico y un co-lípido (normalmente neutro), tal como aminopropil-dimetil-miristoleiloxi-propanaminio bromuro-difitanoilfosfatidil-etanolamina ("Vaxfectin™") o aminopropil-dimetil-bis-dodeciloxi-propanaminio bromuro-dioleoilfosfatidil-etanolamina ("GAP-DLRIE:DOPE"). Se prefieren las formulaciones que contienen (+)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(sin-9-tetradeceniloxi)-1-propanaminio (documento US 6.586.409).
- Monofosforil lípido A 3-O-desacilado (véase anteriormente).
- Compuestos que contienen lípidos unidos a un esqueleto acíclico que contienen fosfato, tales como el antagonista de TLR4 E5564 (Wong y cols. (2003) *J Clin Pharmacol* 43(7):735-42; documento US 2005/0215517):



Coadyuvantes de sales de aluminio

- Se pueden usar los coadyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son convencionales, pero se usan sólo por conveniencia, ya que ninguno es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). La invención puede usar cualquiera de los coadyuvantes "hidróxido" o "fosfato" que en general se usan como coadyuvantes.

- Los coadyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" normalmente son sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son al menos parcialmente cristalinas. El oxihidróxido de aluminio, que se puede representar por la fórmula $\text{AlO}(\text{OH})$, se puede distinguir de otros compuestos de aluminio, tales como hidróxido de aluminio $\text{Al}(\text{OH})_3$, por espectroscopia infrarroja (IR), en particular por la presencia de una banda de adsorción a 1070 cm^{-1} y un fuerte hombro a $3090\text{-}3100 \text{ cm}^{-1}$ (capítulo 9 de *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)). El grado de cristalinidad de un coadyuvante de hidróxido de aluminio se refleja por el ancho de la banda de difracción a media altura (WHH), mostrando las partículas poco cristalinas una mayor ampliación de la línea debido a tamaños de cristallita más pequeños. El área de superficie se incrementa al incrementarse el WHH, y se ha observado que los coadyuvantes con valores de WHH mayores tienen mayor capacidad para la adsorción de antígeno. Una morfología fibrosa (por ejemplo, como la observada en micrografías electrónicas de transmisión) es típica de los coadyuvantes de hidróxido de aluminio. Normalmente, el pH de los coadyuvantes de hidróxido de aluminio es de aproximadamente 11, es decir, el propio coadyuvante tiene una carga

superficial positiva a pH fisiológico. Se han comunicado capacidades adsorptivas de entre 1,8-2,6 mg de proteínas por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para coadyuvantes de hidróxido de aluminio.

Los coadyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" son normalmente hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato sulfato de aluminio). Se pueden obtener por precipitación, y las condiciones y concentraciones de la reacción durante la precipitación influyen en el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal. En general, los hidroxifosfatos tienen una proporción molar de PO_4/Al de entre 0,3 y 1,2. Los hidroxifosfatos se pueden distinguir de $AlPO_4$ estricto por la presencia de grupos hidroxilo. Por ejemplo, una banda de espectro IR a 3164cm^{-1} (por ejemplo, cuando se calienta hasta 200°C) indica la presencia de hidroxilos estructurales (capítulo 9 de *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X)).

En general, la proporción molar de PO_4/Al^{3+} de un coadyuvante de fosfato de aluminio será de entre 0,3 y 1,2, preferentemente de entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente de 0,95+0,1. En general, el fosfato de aluminio será amorfo, en particular para sales de hidroxifosfato. Un coadyuvante típico es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar de PO_4/Al de entre 0,84 y 0,92, incluido a 0,6mg de Al^{3+}/ml . En general, el fosfato de aluminio será particulado (por ejemplo, morfología similar a placa como se observa en micrografías electrónicas de transmisión). Los diámetros típicos de las partículas están en el intervalo de 0,5-20 μm (por ejemplo, de aproximadamente 5 10 μm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se han comunicado capacidades adsorptivas de entre 0,7-1,5 mg de proteínas por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para coadyuvantes de fosfato de aluminio.

El punto de carga cero (PZC) de fosfato de aluminio está inversamente relacionado con el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y de la concentración de los reactivos usados para preparar la sal por precipitación. El PZC también se altera por el cambio en la concentración de iones de fosfato libres en disolución (más fosfato = más PZC ácido) o por la adición de un tampón tal como un tampón de histidina (hace al PZC más básico). En general, el fosfato de aluminio usado de acuerdo con la invención tendrá un PZC de entre 4,0 y 7,0, más preferentemente de entre 5,0 y 6,5, por ejemplo, de aproximadamente 5,7.

Las suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar las composiciones de la invención pueden contener un tampón (por ejemplo, un tampón de fosfato o histidina o Tris), pero esto no siempre es necesario. Las suspensiones son preferentemente estériles y libres de pirógenos. Una suspensión pueden incluir iones fosfato acuosos libres, por ejemplo, presentes en una concentración de entre 1,0 y 20 mM, preferentemente de entre 5 y 15 mM, y más preferentemente de aproximadamente 10 mM. Las suspensiones también pueden comprender cloruro de sodio.

La invención puede usar una mezcla tanto de un hidróxido de aluminio como de un fosfato de aluminio (documento WO01/22992). En este caso, puede tener más fosfato de aluminio que de hidróxido, por ejemplo, una proporción en peso de al menos 2:1, por ejemplo, >5:1, >6:1, >7:1, >8:1, >9:1, etc.

La concentración de Al^{+++} en una composición para su administración a un paciente es preferentemente de menos de 10 mg/ml, por ejemplo, <5 mg/ml, <4 mg/ml, <3 mg/ml, <2 mg/ml, <1 mg/ml, etc. Un intervalo preferido está entre 0,3 y 1 mg/ml.

Así como incluir uno o más coadyuvantes de sales de aluminio, el componente coadyuvante puede incluir uno o más coadyuvantes adicionales o agentes inmunoestimulantes. Estos componentes adicionales incluyen, pero no se limitan a: un coadyuvante monofosforil lípido A 3-O-desacilado ("3d MPL"); y/o una emulsión de aceite en agua. El 3dMPL también se ha denominado como monofosforil lípido A 3 des-O-acilado o como 3-O-desacil-4'-monofosforil-lípido A. El nombre indica que la posición 3 de la glucosamina en el extremo reductor en el monofosforil lípido A es desacilada. Se ha preparado a partir de un mutante sin heptosa de *S. minnesota*, y es químicamente similar al lípido A, pero carece de un grupo fosforilo lábil ácido y un grupo acilo lábil básico. Activa células del linaje monocito/macrófago y estimula la liberación de varias citocinas, incluyendo IL -1, IL-12, TNF α y GM-CSF. La preparación de 3d MPL se describió originalmente en la referencia 150, y el producto ha sido fabricado y vendido por Corixa Corporation bajo el nombre MPL™. Se pueden encontrar otros detalles en Myers y cols. (1990) páginas 145-156 de *Cellular and molecular aspects of endotoxin reactions*; Ulrich (2000) capítulo 16 (páginas 273-282) de *Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols* (Volumen 42 de *Methods in Molecular Methods series*). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan, Johnson y cols. (1999) *J Med Chem* 42:4640-9, Baldrick y cols. (2002) *Regulatory Toxicol Pharmacol* 35:398-413.

Las vacunas producidas por la invención se pueden administrar a los pacientes sustancialmente al mismo tiempo (por ejemplo, durante la misma consulta o visita médica al profesional sanitario) que otras vacunas, por ejemplo, sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna contra el sarampión, una vacuna contra las paperas, una vacuna contra la rubéola, una vacuna triple vírica, una vacuna contra la varicela, una vacuna contra MMRV, una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna contra la tos ferina, una vacuna contra DTP, una vacuna conjugada contra *H.influenzae* de tipo b, una vacuna antipoliomiélfica inactivada, una vacuna contra el virus de la hepatitis B, una vacuna antipneumocócica, etc. La administración sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna antipneumocócica es especialmente útil en pacientes ancianos.

La composición puede incluir un antibiótico.

Las composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz del polipéptido inmunogénico o de los polipéptidos inmunogénicos (es decir, confórmero F de la adhesina bacteriana), así como cualquier otro de los componentes antes mencionados, como sea necesario. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz', se quiere decir que la administración de esa cantidad a un individuo, en una dosis única o bien como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y del estado físico del individuo que se va a tratar, del grupo taxonómico del individuo que se va a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmunitario del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico práctico de la situación médica y otros factores relevantes. Es de esperar que la cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio de tiempo que se pueda determinar por ensayos rutinarios.

Las composiciones inmunogénicas se administran convencionalmente por vía parenteral, por ejemplo, por inyección, por vía subcutánea, intramuscular o bien transdérmica/transcutánea (por ejemplo, el documento WO98/20734). Las formulaciones adicionales adecuadas para otros modos de administración incluyen formulaciones orales y pulmonares, supositorios y aplicaciones transdérmicas. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple. La vacuna se puede administrar junto con otros agentes inmunoreguladores. Como una alternativa a las vacunas basadas en proteínas, se puede emplear vacunación con ADN (por ejemplo, Robison y Torres (1997) *Seminars in Immunology* 9:271-283; Donnelly y cols. (1997) *Annu Rev Immunol* 15:617-648; véase después en el presente documento).

Anticuerpos

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido o un grupo de polipéptidos compuesto de al menos un sitio de combinación del anticuerpo. Un "sitio de combinación del anticuerpo" es el espacio de unión tridimensional con una conformación superficial interna y una distribución de carga complementaria con las características de un epítipo de un antígeno, lo que permite una unión del anticuerpo con el antígeno. El anticuerpo incluye, por ejemplo, anticuerpos vertebrados, anticuerpos híbridos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos alterados, anticuerpos univalentes, proteínas Fab, y anticuerpos de dominio único.

Los anticuerpos frente a las proteínas de la invención son útiles para cromatografía por afinidad, inmunoensayos y para distinguir/identificar proteínas bacterianas.

Los anticuerpos para los confórmeros de la invención, tanto policlonal como monoclonal, se pueden preparar por procedimientos convencionales. En general, en primer lugar se usa la proteína para inmunizar un animal adecuado, preferentemente un ratón, una rata, un conejo o una cabra. Se prefieren conejos y cabras para la preparación de sueros policlonales debido al volumen de suero obtenible y a la disponibilidad de anticuerpos anti-conejo y anti-cabra marcados. Generalmente la inmunización se realiza mezclando o emulsionando la proteína en solución salina, preferentemente en un coadyuvante tal como coadyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión por vía parenteral (generalmente por vía subcutánea o intramuscular). Normalmente, una dosis de 50-200 µg/inyección es suficiente. En general, la inmunización se refuerza 2-6 semanas después con una o más inyecciones de la proteína en solución salina, usando preferentemente coadyuvante incompleto de Freund. De forma alternativa, se pueden generar anticuerpos por inmunización *in vitro* usando procedimientos conocidos en la técnica, lo que, para los propósitos de esta invención, se considera equivalente a la inmunización *in vivo*. Se obtienen antisueros policlonales por el sangrado del animal inmunizado en un recipiente de vidrio o de plástico, incubando la sangre a 25°C durante una hora, seguido de incubación a 40°C durante 2-18 horas. Se recupera el suero por centrifugación (por ejemplo, 1,000 g durante 10 minutos). Se pueden obtener aproximadamente 20-50 ml por sangrado de los conejos.

Se preparan anticuerpos monoclonales usando el procedimiento estándar de Kohler & Milstein (*Nature* (1975) 256:495-96), o una modificación del mismo. Normalmente, se inmuniza un ratón o una rata como se describe anteriormente. Sin embargo, en lugar del sangrado del animal para extraer el suero, se retira el bazo (y opcionalmente varios ganglios linfáticos grandes) y se disocian en células individuales. Si se desea, se pueden rastrear las células del bazo (después de retirar las células no específicamente adherentes) aplicando una suspensión de células a una placa o a un pocillo recubierto con el antígeno de proteínas, las células B que expresan inmunoglobulina unida a membrana específicas para el antígeno se unen a la placa, y no se aclaran con el resto de la suspensión. Las células B resultante, o todas las células del bazo disociadas, se inducen entonces para fusionarse con células de mieloma para formar hibridomas, y se cultivan en un medio selectivo (por ejemplo, medio de hipoxantina, aminopterina, timidina, "HAT"). Se plaquean los hibridomas resultantes limitando la dilución, y se evalúan para determinar la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno inmunizante (y que no se unen a antígenos no relacionados). Después, se cultivan los hibridomas que secretan MAb *in vitro* (por ejemplo, en frascos de cultivo tisular o reactores de fibra hueca) o bien *in vivo* (como ascitis en ratones).

Si se desea, se pueden marcar los anticuerpos (sean policlonales o monoclonales) usando técnicas convencionales. Los marcadores adecuados incluyen fluoróforos, cromóforos, átomos radioactivos (en particular, ³²P y ¹²⁵I), reactivos densos en electrones, enzimas, y ligandos que tienen parejas de unión específicas. Normalmente, las enzimas se

detectan por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano se detecta normalmente por su capacidad para convertir 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en un pigmento azul, cuantificable con un espectrofotómetro. "Pareja de unión específica" se refiere a una proteína que se puede unir a una molécula de ligando con alta especificidad, como, por ejemplo, en el caso de un antígeno y un anticuerpo monoclonal específico para ello. Otras parejas de unión específicas incluyen biotina y avidina o estreptavidina, IgG y proteína A, y los numerosos acoplamientos receptor-ligando conocidos en la técnica. Se debe entender que la descripción anterior no pretende categorizar los diferentes marcadores en distintas clases, ya que el mismo marcador puede servir en varios modos diferentes. Por ejemplo, ¹²⁵I puede servir como un marcador radioactivo o como un reactivo denso en electrones. HRP puede servir como enzima o como antígeno para un MAb. Además, se pueden combinar diferentes marcadores para el efecto deseado. Por ejemplo, los MAb y avidina también requieren marcadores en la práctica de esta invención: por tanto, se podría marcar un MAb con biotina, y detectar su presencia con avidina marcada con ¹²⁵I, o con Mab anti-biotina marcado con HRP. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica y se consideran como equivalentes dentro del alcance de esta invención.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender polipéptidos o bien anticuerpos de la invención. Las composiciones farmacéuticas comprenderán una cantidad terapéuticamente eficaz de polipéptidos, anticuerpos o bien polinucleótidos de la invención reivindicada.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección deseada, o para exhibir un efecto terapéutico o preventivo detectable. Se puede detectar el efecto, por ejemplo, por marcadores químicos o por niveles de antígenos. Los efectos terapéuticos también incluyen la reducción en los síntomas físicos, tales como una disminución en la temperatura corporal. La cantidad efectiva precisa para un sujeto dependerá del tamaño y de la salud del sujeto, la naturaleza y el grado de la afección, y del producto terapéutico o de la combinación de productos terapéuticos seleccionados para la administración. Por tanto, no es útil especificar una cantidad efectiva exacta como adelantado. Sin embargo, se puede determinar la cantidad efectiva para una situación dada por experimentación rutinaria y está dentro del juicio del médico clínico.

Las dosificaciones preferidas para productos farmacéuticos basados en proteínas estarán entre 5 y 500 µg de los polipéptidos inmunogénicos de la presente invención.

Una composición farmacéutica también puede contener un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico, tal como anticuerpos o un polipéptido, genes, y otros agentes terapéuticos. El término se refiere a cualquier vehículos farmacéuticos que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el receptor individual que recibe la composición, y que se pueda administrar sin toxicidad indebida. Los vehículos adecuados pueden ser macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas víricas inactivas. Estos vehículos se conocen bien por los expertos en la técnica.

En el presente documento se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Está disponible un minucioso debate sobre excipientes farmacéuticamente aceptables en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Los vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, pueden estar presentes en estos vehículos sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras de pH, y similares. Normalmente, las composiciones terapéuticas se preparan como inyectables, como soluciones líquidas o bien como suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para su solución, o para su suspensión, en vehículos líquidos antes de la inyección. Los liposomas están incluidos dentro de la definición de un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Procedimientos de administración

Una vez formuladas, se pueden administrar las composiciones de la invención directamente al sujeto. Los sujetos que van a ser tratados pueden ser animales; en particular, se pueden tratar sujetos humanos.

Una vez formuladas, se pueden administrar las composiciones de la invención (1) directamente al sujeto o (2) suministrar *ex vivo*, a células derivadas del sujeto. Los sujetos que se van a tratar pueden ser mamíferos o aves. Asimismo, se pueden tratar sujetos humanos.

En general, la administración directa de las composiciones se lleva a cabo por inyección, por vía subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o bien intramuscular, intranasal, o bien se administra en el espacio intersticial de un tejido. También se pueden administrar las composiciones en una lesión. Otros modos de administración incluyen la

administración oral y pulmonar, supositorios, y aplicaciones transdérmicas o transcutáneas (por ejemplo, véase el documento WO98/20734), agujas, y pistolas génicas o hipopulverizadores. El tratamiento de dosificación puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiple.

5 Los procedimientos para el suministro *ex vivo* y reimplantación de células transformadas en un sujeto se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, el documento WO93/14778. Ejemplos de células útiles en aplicaciones *ex vivo* incluyen, por ejemplo, células madre, particularmente hematopoyéticas, linfocitos, macrófagos, células dendríticas o células tumorales.

Composiciones farmacéuticas de polipéptidos

10 Además de los vehículos y las sales farmacéuticamente aceptables descritos anteriormente, se pueden usar los siguientes agentes adicionales con las composiciones de polipéptidos.

i. Polipéptidos

15 Un ejemplo son polipéptidos que incluyen, sin limitación: asialoorosomucoide (ASOR); transferrina; asialoglicoproteínas; anticuerpos; fragmentos de anticuerpos; ferritina; interleucinas; interferones, granulocito, factor estimulador de colonias de macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de células madre y eritropoyetina. También se pueden usar antígenos víricos, tales como proteínas de la envoltura. Asimismo, proteínas de otros organismos invasivos, tales como el péptido de 17 aminoácidos de la proteína del circumsporozoito de *Plasmodium falciparum* conocido como RII.

ii. Hormonas, vitaminas, etc.

20 Otros grupos que se pueden incluir son, por ejemplo: hormonas, esteroides, andrógenos, estrógenos, hormona tiroide o vitaminas, ácido fólico.

iii. Polialquilenos, polisacáridos, etc.

Asimismo, se puede inducir polialquilenglicol con los polipéptidos deseados. En una realización preferida, el polialquilenglicol es polietilenglicol. Además, se pueden incluir mono-, di- o polisacáridos. En una realización preferida de este, el polisacárido es dextrano o DEAE-dextrano. Asimismo, quitosán y poli(láctido-co-glucólido)

iv. Lípidos y liposomas

25 El polipéptido deseado también se puede encapsular en lípidos o envasar en liposomas antes de suministrarlo al sujeto o a células derivadas de él.

30 En general, la encapsulación de lípidos se lleva a cabo usando liposomas que se pueden unir o atrapar de forma estable y retener el ácido nucleico. La proporción de polinucleótido condensado con respecto a la preparación de lípido puede variar pero generalmente será de alrededor de 1:1 (mg de ADN: micromoles de lípido), o más del lípido. Para una revisión del uso de liposomas como vehículos para el suministro de ácidos nucleicos, véase Hug y Sleight (1991) *Biochim. Biophys. Acta.* 1097:1-17; Straubinger (1983) *Meth. Enzymol.* 101:512-527.

35 Las preparaciones de liposomas para su uso en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. Los liposomas catiónicos han mostrado que median en el suministro intracelular de ADN de plásmido (Feigner (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7416); ARNm (Malone (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6077-6081); y factores de transcripción purificados (Debs (1990) *J. Biol. Chem.* 265:10189-10192), en forma funcional.

40 Los liposomas catiónicos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, los liposomas de N(1-2, 3-dioleiloil)propil)-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) están disponibles bajo la marca comercial Lipofectin, de GIBCO BRL, Grand Island, NY. (Véase también, Feigner, anteriormente). Otros liposomas comercialmente disponibles incluyen transfectace (DDAB/DOPAR) y DOTAP/DOPAR (Boerhinger). Se pueden preparar otros liposomas catiónicos a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Szoka (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:4194-4198; el documento WO90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas de DOTAP (1,2 -bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano).

45 De forma similar, los liposomas aniónicos y neutros están fácilmente disponibles, tales como de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL), o se pueden preparar fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Estos materiales incluyen fosfatidil colina, colesterol, fosfatidil etanolamina, dioleoilfosfatidil colina (DOPC), dioleoilfosfatidil glicerol (DOPG), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPAR), entre otros. También se pueden mezclar estos materiales con los materiales de partida de DOTMA y DOTAP en proporciones apropiadas. Los procedimientos para preparar liposomas usando estos materiales son muy conocidos en la técnica.

50 Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV) o vesículas unilamelares grandes (LUV). Los distintos complejos liposoma-ácido nucleico se preparan usando

procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Straubinger (1983) Meth. Immunol. 101:512-527; Szoka (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4194-4198; Papahadjopoulos (1975) Biochim. Biophys. Acta 394:483; Wilson (1979) Cell 17:77; Deamer y Bangham (1976) Biochim. Biophys. Acta 443:629; Ostro (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 76:836; Fraley (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3348; Enoch y Strittmatter (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:145; Fraley (1980) J. Biol. Chem. (1980) 255:10431; Szoka y Papahadjopoulos (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:145; y Schaefer-Ridder (1982) Science 215:166.

v. Lipoproteínas

Además, las lipoproteínas se pueden incluir con el polipéptido que se va a liberar. Ejemplos de lipoproteínas que se van utilizar incluyen: quilomicrones, HDL, IDL, LDL y VLDL. También se pueden usar mutantes, fragmentos o fusiones de estas proteínas. Asimismo, se pueden usar modificaciones de lipoproteínas que se producen de forma natural, tales como LDL acetilado. Estas lipoproteínas pueden dirigir el suministro de polinucleótidos a las células que expresan receptores de lipoproteínas. Preferentemente, si se incluyen lipoproteínas con el polinucleótido que se va a suministrar, no se incluyen ningún otro ligando dirigido en la composición.

Las proteínas que se producen de forma natural comprenden un lípido y una porción de proteína. La porción de proteína se conoce como apoproteínas. Actualmente, se han aislado e identificado las apoproteínas A, B, C, D y E. Al menos dos de estas contienen varias proteínas, designadas por números romanos, AI, AII, AIV; IC, CII, CIII.

Una lipoproteína puede comprender más de una apoproteína. Por ejemplo, los quilomicrones que se producen de forma natural comprenden A, B, C y E; con el tiempo, estas lipoproteínas pierden las apoproteínas A y adquieren las C y E. VLDL comprende las apoproteínas A, B, C y E, LDL comprende la apoproteína B; y HDL comprende las apoproteínas A, C y E. El aminoácido de estas apoproteínas es conocido y se describe, por ejemplo, por Breslow (1985) Annu Rev. Biochem 54:699; Law (1986) Adv. Exp Med. Biol. 151:162; Chen (1986) J Biol Chem 261:12918; Kane (1980) Proc Natl Acad Sci USA 77:2465; y Utermann (1984) Hum Genet 65:232.

Las lipoproteínas contienen una variedad de lípidos incluyendo, triglicéridos, colesterol (libre y ésteres) y fosfolípidos. La composición de los lípidos varía en las lipoproteínas que se producen de forma natural. Por ejemplo, los quilomicrones comprenden principalmente triglicéridos. Una descripción más detallada del contenido en lípidos de las lipoproteínas que se producen de forma natural se puede encontrar, por ejemplo, en Meth. Enzymol. 128 (1986). La composición de los lípidos se elige para ayudar en la conformación de la apoproteína para su actividad de unión a receptores. La composición de lípidos también se puede elegir para facilitar la interacción hidrófoba y la asociación con la molécula de unión a polinucleótidos.

Las lipoproteínas que se producen de forma natural se pueden aislar del suero por ultracentrifugación, por ejemplo. Tales procedimientos se describen en Meth. Enzymol. (anteriormente); Pitas (1980) J. Biochem. 255:5454-5460 y Mahey (1979) J Clin. Invest 64: 743-750. Las lipoproteínas también se pueden producir por procedimientos *in vitro* o recombinantes por expresión de los genes de apoproteínas en una célula huésped deseada. Véase, por ejemplo, Atkinson (1986) Annu Rev Biophys Chem 15:403 y Radding (1958) Biochim BiophysActa 30:443. Las lipoproteínas también se pueden adquirir de proveedores comerciales, tales como Biomedical Technologies, Inc., Stoughton, Massachusetts, Estados Unidos. Otra descripción de lipoproteínas se puede encontrar en Zuckermann y cols., documento WO98/06437.

vi. Agentes policatiónicos

Se pueden incluir agentes policatiónicos, con o sin lipoproteína, en una composición con el polinucleótido/polipéptido deseado que se va a suministrar.

Normalmente, los agentes policatiónicos muestran una carga neta positiva a pH fisiológico relevante y pueden neutralizar la carga eléctrica de ácidos nucleicos para facilitar el suministro en una ubicación deseada. Estos agentes tienen aplicaciones tanto *in vitro*, *ex vivo* como *in vivo*. Se pueden usar agentes policatiónicos para suministrar ácidos nucleicos a un sujeto vivo por vía intramuscular o bien por vía subcutánea, etc. Los siguientes son ejemplos de polipéptidos útiles como agentes policatiónicos: polilisina, poliarginina, poliornitina y protamina. Otros ejemplos incluyen histonas, protaminas, albúmina sérica humana, proteínas de unión a ADN, proteínas cromosómicas no de histona, proteínas de recubrimiento de virus de ADN, tales como (X174, factores transcripcionales que contienen también dominios que se unen a ADN y por lo tanto, pueden ser útiles como agentes de condensación de ácidos nucleicos. En resumen, los factores transcripcionales tales como C/CEBP, c-jun, c-fos, AP-1, AP-2, AP-3, CPF, Prot-1, Sp-1, Oct-1, Oct-2, CREP y TFIID contienen dominios básicos que se unen a secuencias de ADN.

Los agentes policatiónicos orgánicos incluyen: espermina, espermidina y putrescina.

Las dimensiones y las propiedades físicas de un agente policatiónico se pueden extrapolar de la lista anterior, para construir otros agentes policatiónicos polipéptidos o para producir agentes policatiónicos sintéticos.

Los agentes policatiónicos sintéticos que son útiles incluyen, por ejemplo, DEAE-dextrano, polibreno. Lipofectin™ y lipofectAMINE™ son monómeros que forman complejos policatiónicos cuando se combinan con

polinucleótidos/polipéptidos.

Ensayos de inmunodiagnóstico

- 5 Otro aspecto de la presente invención incluye confórmers de GBS80 de la presente invención usados en inmunoensayos para detectar niveles de anticuerpos (o, por el contrario, se pueden usar anticuerpos de confórmer F de la adhesina bacteriana para detectar niveles de confórmer). Se pueden desarrollar inmunoensayos basados en antígenos recombinantes, bien definidos, para reemplazar procedimientos de diagnóstico invasivos. Se pueden detectar anticuerpos dentro de muestras biológicas, incluyendo por ejemplo, muestras de sangre o de suero. El diseño de los inmunoensayos está sujeto a una gran cantidad de variaciones, y una variedad de éstos se conocen en la técnica. Los protocolos para el inmunoensayo se pueden basar, por ejemplo, en ensayo de competición, o de reacción directa o de tipo sándwich. Los protocolos también pueden usar, por ejemplo, soportes sólidos, o pueden ser por inmunoprecipitación. La mayoría de los ensayos implican el uso de anticuerpo o polipéptido marcado; los marcadores pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas o colorantes. También se conocen ensayos que amplifican las señales de la sonda; ejemplos de éstos son ensayos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos mediados y marcados de enzimas, tales como ensayos ELISA.
- 10
- 15 Los kits adecuados para inmunodiagnóstico y que contengan los reactivos marcados apropiados se construyen envasando los materiales apropiados, incluyendo las composiciones de la invención, en recipientes adecuados, junto con los restantes reactivos y materiales (por ejemplo, tampones adecuados, soluciones de sales, etc.) requeridos para llevara cabo el ensayo, así como el conjunto adecuado de instrucciones de ensayo.

General

- 20 El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X+Y. El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x significa, por ejemplo, x+10%. La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que es "sustancialmente libre" de Y puede ser completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" se puede omitir de la definición de la invención.
- 25

Las secuencias incluidas para facilitar la clonación o la purificación, etc., no contribuyen necesariamente a la invención y se pueden omitir o retirar.

Breve descripción de dibujos y tablas

- La FIGURA 1 muestra un SDS-PAGE de GBS. 80 isoformas purificadas.
- 30 La FIGURA 2 muestra una filtración en gel analítica en un Superdex 200 10/30 de las mismas muestras con PBS como tampón y un flujo de 0,5 ml/min.
- La FIGURA 3 muestra una filtración en gel analítica del lote 3 y del lote F a diferentes tiempos y pH.
- La FIGURA 4A muestra una filtración en gel analítica de 5 lotes de GBS 80 diferentes.
- La FIGURA 4B muestra los pesos moleculares de 5 lotes de GBS 80 diferentes como se determina con espectrometría MALDI-TOF.
- 35 La FIGURA 5 muestra un SDS-PAGE después de digestión con diferentes proteasas, con y sin desnaturalización con detergente.
- La FIGURA 6 muestra una tabla que resume los resultados de la inmunización materna activa.

Ejemplo 1: Purificación de isoformas de GBS 80

- 40 *Producción en lotes de GBS 80 en E.coli. recombinante* Se llevó a cabo una fermentación en lotes de *E. coli* recombinante que expresa GBS 80 usando un biorreactor de mesa de Applikon de cinco litros (Applikon Dependable Instruments B.V., Países Bajos). Se inoculó el fermentador con cultivos de siembra de crecimiento completo que se hicieron crecer a 25°C durante 16 horas en dos matraces Erlenmeyer de rotación que contenían 500 ml de medio de extracto de levadura (45 g de extracto de levadura por litro; 1,5 g de NaCl por litro; 1,10 g de glucosa por litro; pH 7,0).
- 45 Para la fermentación principal, se usó un medio de complejo. El medio contenía (por litro) 45 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 10 g de glicerol, pH 7,0. Se llevó a cabo la fermentación a 25°C. El pH del cultivo se mantuvo automáticamente a $7,1 \pm 0,1$ usando hidróxido de sodio o ácido fosfórico como valorantes. Se mantuvieron condiciones completamente aerobias (tensión de oxígeno disuelto al 40%) inyectando aire y oxígeno, ambos a una velocidad de 0,5 litro estándar de aire por litro de caldo por min (= 0,5 vvm), en la región del propulsor que estaba rotando a aproximadamente 800 rpm. Se hicieron crecer las células hasta 3 OD y después se indujeron con IPTG 0,25 mM durante 3 horas antes de la recogida. En el momento de la inducción, también se añadieron MgSO₄ 1mM, CaCl₂ 1mM y 5 g/l de glicerol.
- 50

Procedimiento de purificación para el confórmero A. Se resuspendieron células de la fermentación en 60 ml de Tris 25 mM/HCl 25 (pH 7,0) que contenían EDTA 10 mM, PMSF 2 mM y 100 unidades de Kunitz de ADNsa A, y se lisaron por un doble paso a través de una prensa French a 18000 psi. Se retiraron las células no rotas y el material insoluble por centrifugación a 50.000 x g durante 30 min. El sobrenadante tenía el pH ajustado a 7,0 con NaOH 0,1 M, se filtró de forma estéril a través de un filtro de 0,22 mm (Millipore), diluido con agua MilliQ™ hasta 300 ml para obtener una conductividad de aproximadamente 2,5 mS/cm y se sometió a cromatografía por intercambio de iones sobre una columna de Q-Sefarosa FF (Amersham Biosciences). Se cargaron los 300 ml de lisado sobre una columna de Q-sefarosa FF con un volumen de columna de 80 ml que se habían equilibrado previamente con Tris 25 mM/HCl (pH 7,0). Se lavó posteriormente la columna con seis volúmenes de columna del mismo tampón, y se eluyeron las proteínas con un gradiente lineal de NaCl 0-500 mM en el mismo tampón. Se analizó la muestra eluida para determinar el confórmero A de la proteína GBS 80 por SDS-PAGE al 12% teñido con azul brillante de Coomassie R-250, y se agruparon las fracciones de interés. Se aplicó posteriormente el confórmero A de GBS 80 agrupado de Q-sefarosa FF (60 ml) sobre una columna de sefarosa FF quelante de 75 ml (Amersham Biosciences) que se habían cargada con CuSO₄ y equilibrada con Na-fosfato 20 mM, NaCl 1 M, pH 7,2 (tampón A). Se lavó la columna con cuatro volúmenes de columna de tampón A, y se eluyeron las proteínas con un gradiente lineal de 0-100% de tampón B (tampón B: Na-fosfato 20 mM, NH₄Cl 1M, pH 7,2). Se analizó la muestra eluida para determinar el confórmero A de la proteína GBS 80 por SDS-PAGE al 12% teñido con azul brillante de Coomassie R-250, y se agruparon las fracciones de interés. El confórmero A de GBS 80 agrupado de sefarosa FF quelante (140 ml) se concentró después con proteína hasta 15 ml bajo presión de nitrógeno en una célula de concentración Amicon, filtro 30 YM (Millipore) límite 30 KDa, y se aplicó en tres series, cada una cargando 5 ml de solución de proteínas, en una columna Superdex 75 HiLoad 26/60 (Amersham Biosciences) que se habían equilibrado con solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2 (PBS). Se analizó la muestra eluida para determinar el confórmero A de la proteína GBS 80 por SDS-PAGE al 12% teñido con azul brillante de Coomassie R-250, y se agruparon las fracciones de interés. Después se estimó la pureza del confórmero A de la proteína GBS 80 agrupado por SDS-PAGE al 12% y filtración en gel analítica, y se confirmó la identidad por análisis de aminoácidos N-terminales (secuenciador de proteínas 491 cLC, Applied Biosystems), espectrometría de masas y transferencia de tipo Western.

Procedimiento de purificación para el confórmero F. Se resuspendieron células de la fermentación en 100 ml de Tris 25 mM/HCl 25 (pH 7,2) que contenían PMSF 2 mM y 100 unidades de Kunitz de ADNsa A, y se lisaron por un doble paso a través de una prensa French a 18000 psi. Se retiraron las células no rotas y el material insoluble por centrifugación a 50.000 x g durante 30 min. El sobrenadante tenía el pH ajustado a 7,2 con NaOH 0,1 M, se filtró de forma estéril a través de un filtro de 0,22 mm (Millipore), diluido con agua MilliQ™ hasta 300 ml para obtener una conductividad de aproximadamente 2,1 mS/cm y se sometió a cromatografía por intercambio de iones sustractiva sobre una columna de Q-Sefarosa FF (Amersham Biosciences). Se cargaron los 300 ml de lisado sobre una columna de Q-sefarosa FF con un volumen de columna de 80 ml que se habían equilibrado previamente con Tris /HCl 20 mM, pH 7,7. Al flujo continuo agrupado que contenía el confórmero F de GBS 80 se le añadió tampón fosfato de sodio hasta una concentración final de 10 mM y se ajustó el pH hasta 6,8 con NaOH 0,1 M. Posteriormente, se aplicó el flujo continuo agrupado sobre una columna HT de Bio-Gel de hidroxapatita de 70 ml (Bio-Rad) equilibrada con fosfato de sodio 10 mM, pH 6,8. Se lavó la columna con cuatro volúmenes de columna del mismo tampón de equilibrio, y se eluyeron las proteínas con un gradiente lineal de fosfato de sodio 10-500 mM, pH 6,8. Se analizó la muestra eluida para determinar el confórmero F de la proteína GBS 80 por SDS-PAGE al 12% teñido con azul brillante de Coomassie R-250, y se agruparon las fracciones de interés. El confórmero F de GBS 80 agrupado de HT de Bio-Gel de hidroxapatita (130 ml) se concentró después con proteína hasta 12 ml bajo presión de nitrógeno en una célula de concentración Amicon, filtro 30 YM (Millipore) límite 30 KDa, y se aplicó en tres series, cada una cargando 4 ml de solución de proteínas, en una columna Superdex 75 HiLoad 26/60 (Amersham Biosciences) que se habían equilibrado con solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2 (PBS). Se analizó la muestra eluida para determinar el confórmero F de la proteína GBS 80 por SDS-PAGE al 12% teñido con azul brillante de Coomassie R-250, y se agruparon las fracciones de interés. Después se estimó la pureza del confórmero F de la proteína GBS 80 agrupado por SDS-PAGE al 12% y filtración en gel analítica, y se confirmó la identidad por análisis de aminoácidos N-terminales (secuenciador de proteínas 491 cLC, Applied Biosystems), espectrometría de masas y transferencia de tipo Western.

50 **Ejemplo 2: SDS-PAGE y filtración en gel analítica**

Separación por SDS-PAGE. Se cargaron muestras de tres lotes de GBS 80 diferentes sobre una electroforesis en gel con dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE) con y sin desnaturalización por calor previa (5 minutos a 99°C). Los tres lotes son los siguientes:

- Lote 3: GBS 80 purificado de acuerdo con el protocolo del "confórmero A" anterior;
- 55 - Lote F: GBS 80 recuperado en el flujo a través de la purificación del lote 3;
- Lote G-HA: GBS 80 purificado de acuerdo con el protocolo del "confórmero F" anterior.

La figura 1 muestra los resultados de este experimento. Son visibles dos bandas principales, correspondientes a los confórmeros A y al confórmero F. El confórmero F muestra un menor peso molecular aparente en comparación con el confórmero A. Como se esperaba, el lote 3 aparece enriquecido con el confórmero A, mientras que el lote F y el lote

F-HA están enriquecidos con el confórmero F. Cuando se hierven las muestras, las dos isoformas son indistinguibles y tienen la misma movilidad electroforética que el confórmero A. Esto demuestra que el confórmero F es más estable que el confórmero A, que probablemente esté desnaturizado por el SDS en el que el confórmero F requiere de ebullición para desnaturizar.

5 *Cromatografía de exclusión por tamaño.* En consecuencia, también se observó una anomalía similar cuando se aplicaron las mismas preparaciones de proteínas a una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). En resumen, se aplicaron muestras en un volumen final de 100 µl a una columna de filtración en gel Superdex 200 HR10/30 (Amersham Biosciences) equilibrada con un tampón de columna. Se conectó la columna a un sistema purificador AKTA (Amersham Biosciences). Se completó la cuantificación de picos del perfil de elución obtenido a 280
10 nm de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La figura 2 muestra cromatogramas de muestras a partir de los mismos lotes. Se pueden distinguir claramente dos picos principales de material de absorción UV con distintos volúmenes de elución de aproximadamente 12,3 y 13,3 ml.

La espectrometría de masas (EM) MALDI de muestras desde 5 lotes de GBS 80 diferentes (3 enriquecidos con el confórmero F y tres con el confórmero A) reveló que los pesos moleculares de las diferentes isoformas son consistentes con el PM teórico de 52.872 Da calculado para el fragmento expresado de duración completa, mostrando que las dos isoformas tienen las mismas secuencias o muy similares (véanse las figuras 4a y 4b).
15

Ejemplo 3: Estabilidad sobre el tiempo y el pH

Se realizaron pruebas de estabilidad para evaluar el incremento en la estabilidad del confórmero F de GBS 80 con respecto al tiempo y al pH. En la figura 3, se comunican los cromatogramas de las muestras procesadas.

20 El panel izquierdo muestra que una preparación de GBS 80 enriquecida con el confórmero A (lote 3) es menos estable con el tiempo ya que experimenta una redistribución de pico. Los cromatogramas de una prep. de GBS 80 enriquecida con el confórmero F (lote F, panel derecho) son, por el contrario, bastante estables con el tiempo incluso a diferentes pH.

25 Se puede señalar que el pico de absorbancia correspondiente al confórmero A disminuye con el tiempo mientras la preparación se eluye como un pico polidisperso. El confórmero A se convierte en el confórmero F y en otros confórmeros con un mayor PM aparente (asociado más probablemente con la formación de oligómeros).

Ejemplo 4: Digestión por proteasas

El confórmero A y el confórmero F muestran diferentes sensibilidades a la digestión por proteasas. La figura 5 muestra los resultados de digestión de ambos confórmeros con tres proteasas diferentes (proteínaasa K, tripsina y AspN) tanto
30 con como sin tratamiento previo con detergente como sigue.

Se desnaturizaron por calor los confórmeros A y F recombinantes purificados 5 min a 95°C después de la adición de un 0,1% final de "RapiGest" SF (Superficiales, Manchester, Reino Unido). Se añadieron las proteasas en proporciones de sustrato/enzima de 50/1 (p/p) a proteínas recombinantes desnaturizadas o no desnaturizadas. Se dejó que las reacciones progresaran 2 horas a 37°C, y se pararon por adición de un 0,2% de ácido fórmico final. Se
35 desnaturizaron dos µg de productos de digestión en un tampón de carga de muestra (Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8, 10% (v/v) glicerol, SDS al 2% (p/v), DTT 100 mM, 10 µg/ml de azul de bromofenol) y se cargaron sobre SDS-PAGE de acrilamida al 12%. Se tiñeron los geles con azul de Coomassie.

40 Como se muestra en la figura 5, el confórmero F es más resistente a la digestión. En particular, no se digirió una banda con un peso molecular aparente de aproximadamente 50 kDa, incluso después de desnaturización con "RapiGest" SF. Esta banda (anotada con un asterisco) corresponde a la parte C-terminal de la proteína como se define por la huella de masas de péptidos trípticos (resultado no mostrado). Además, los péptidos liberados por estas digestiones son péptidos pertenecientes a la parte N-terminal de la proteína, como se evidencia por análisis de espectrometría de masas (resultados no mostrados).

Ejemplo 6: Resultados de inmunización materna activa

45 Se usaron ambos confórmeros purificados para inmunizar grupos de ratones adultos hembra que, al final del programa de inmunización, se aparearon. Después se expuso la descendencia derivada con una dosis de GBS calculada para matar a un 80-90% de las crías. Como se muestra en la tabla 1, la inmunización con el confórmero F da un mayor nivel de protección.

50 Como se usa en el presente documento, un ensayo de inmunización materna activa se refiere a un ensayo de protección *in vivo* en el que los ratones hembra están inmunizados con la composición de antígeno de prueba. Después se aparean los ratones hembra y se exponen sus crías con una dosis letal de GBS. Se miden los títulos séricos de los ratones hembras durante el programa de inmunización así como el tiempo de supervivencia de las crías después de la exposición.

5 Específicamente, los ensayos de inmunización materna activa referidos en el presente documento usaron grupos de cuatro ratones hembra CD-1 (Charles River Laboratories, Calco Italia). Se inmunizaron por vía intraperitoneal estos ratones con cada confórmero purificado en coadyuvante de Freund en los días 1, 21 y 35, antes de proceder a la cría. Ratones de 6-8 semanas de edad recibieron 20 mg de proteínas/dosis. Se monitorizó la respuesta inmunitaria de las madres usando muestras de suero muestras tomadas en el día 0 y 49. Se aparearon los ratones hembra 2-7 días después de la última inmunización (aproximadamente a $t = 36 - 37$) y, normalmente tuvieron un periodo de gestación de 21 días. Dentro de las 48 horas de vida, se expusieron vía i.p. las crías con GBS en una dosis aproximadamente igual a una cantidad que podría ser suficiente para matar a un 70 - 90% de las crías no inmunizadas (como se determina por datos empíricos recogidos de los grupos de control de PBS). La dosis de exposición de EI GBS se administra preferentemente en 50 μ l de medio THB. Preferentemente, la exposición de las crías tiene lugar en 56 a 61 días después de la primera inmunización. Se prepararon inóculos de exposición a partir de cultivos congelados diluidos hasta la concentración apropiada con THB antes de su uso. Se monitorizó la supervivencia de las crías durante 5 días después de la exposición

10 Como se muestra en la tabla 6, la inmunización con el confórmero F da un mayor nivel de protección.

15

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS AG

Maione, Domenico

5 Norais, Nathalie

Grandi, Guido

<120> CONFÓRMEROS DE ADHESINAS BACTERIANAS

10 <130> 22300-31014.00

<140> PCT/

<141> 11 de junio de 2007

15 <ism> 60/812145

<151> 09 de junio de 2006

<160> 13

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

20

<210> 1

<211> 1662

<212> ADN

<213> Streptococcus Agalactiae

25 <400> 1

ES 2 370 281 T3

```

atgaaattat cgaagaagtt attgttttcg gctgctgttt taacaatggt ggcgggggtca 60
actgttgaac cagtagctca gtttgcgact ggaatgagta ttgtaagagc tgcagaagtg 120
tcacaagaac gcccgcgaa aacaacagta aatatctata aattacaagc tgatagttat 180
aatcggaaa ttacttctaa tgggtggtatc gagaataaag acggcgaagt aatatctaac 240
tatgctaaac ttggtgacaa tgtaaaaggt ttgcaagggtg tacagtttaa acgttataaa 300
gtcaagacgg atatctctgt tgatgaattg aaaaaattga caacagttga agcagcagat 360
gcaaaagttg gaacgattct tgaagaaggt gtcagtctac ctcaaaaaac taatgctcaa 420
ggtttggtcg tcgatgctct ggattcaaaa agtaatgtga gatacttgta tgtagaagat 480
ttaagaatt caccttcaaa cattaccaaa gcttatgctg taccgtttgt gttggaatta 540
ccagttgcta actctacagg tacaggtttc ctttctgaaa ttaatattha ccctaaaaac 600
gttgtaactg atgaacccaa aacagataaa gatgttaaaa aattaggtca ggacgatgca 660
ggttatacga ttggtgaaga attcaaatgg ttcttgaaat ctacaatccc tgccaattta 720
ggtgactatg aaaaatttga aattactgat aaatttgag atggcttgac ttataaatct 780
gttggaaaaa tcaagattgg ttcgaaaaca ctgaatagag atgagcacta cactattgat 840
gaaccaacag ttgataacca aaatacatta aaaattacgt ttaaccaga gaaatttaaa 900
gaaattgctg agctacttaa aggaatgacc cttgttaaaa atcaagatgc tcttgataaa 960
gctactgcaa atacagatga tgcggcattt ttggaaattc cagttgcatc aactattaat 1020
gaaaaagcag ttttaggaaa agcaattgaa aatacttttg aacttcaata tgaccatact 1080
cctgataaag ctgacaatcc aaaaccatct aatcctcaa gaaaaccaga agttcatact 1140
ggtgggaaac gatttgtaaa gaaagactca acagaaacac aaacactagg tgggtgctgag 1200
tttgatttgt tggcttctga tgggacagca gtaaaatgga cagatgctct tattaaagcg 1260
aatactaata aaaactatat tgctggagaa gctgttactg ggcaaccaat caaattgaaa 1320
tcacatacag acggtacggt tgagattaaa ggtttggctt atgcagttga tgcgaatgca 1380
gagggtacag cagtaactta caaattaaa gaaacaaaag caccagaagg ttatgtaatc 1440
cctgataaag aaatcgagtt tacagtatca caaacatctt ataatacaaa accaactgac 1500
atcacggttg atagtgctga tgcaacacct gatacaatta aaaacaacia acgctcctca 1560
atccctaata ctgggtggtat tgggtacggct atctttgctg ctatcgggtgc tgcgggtgatg 1620
gcttttgctg ttaaggggat gaagcgtcgt acaaaagata ac 1662

```

<210>2

<211>554

<212> PRT

5 <213> Streptococcus Agalactiae

<400> 2

Met	Lys	Leu	Ser	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Ser	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Met
1				5					10					15	
Val	Ala	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Pro	Val	Ala	Gln	Phe	Ala	Thr	Gly	Met
			20					25					30		
Ser	Ile	Val	Arg	Ala	Ala	Glu	Val	Ser	Gln	Glu	Arg	Pro	Ala	Lys	Thr
		35					40					45			
Thr	Val	Asn	Ile	Tyr	Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	Ser	Tyr	Lys	Ser	Glu	Ile
		50				55					60				
Thr	Ser	Asn	Gly	Gly	Ile	Glu	Asn	Lys	Asp	Gly	Glu	Val	Ile	Ser	Asn
65					70					75					80
Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly	Asp	Asn	Val	Lys	Gly	Leu	Gln	Gly	Val	Gln	Phe
				85					90					95	
Lys	Arg	Tyr	Lys	Val	Lys	Thr	Asp	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Lys	Lys
			100					105					110		
Leu	Thr	Thr	Val	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Lys	Val	Gly	Thr	Ile	Leu	Glu
			115					120					125		
Glu	Gly	Val	Ser	Leu	Pro	Gln	Lys	Thr	Asn	Ala	Gln	Gly	Leu	Val	Val
						135					140				
Asp	Ala	Leu	Asp	Ser	Lys	Ser	Asn	Val	Arg	Tyr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp
145					150					155					160
Leu	Lys	Asn	Ser	Pro	Ser	Asn	Ile	Thr	Lys	Ala	Tyr	Ala	Val	Pro	Phe
				165					170					175	
Val	Leu	Glu	Leu	Pro	Val	Ala	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Gly	Phe	Leu	Ser
			180					185					190		
Glu	Ile	Asn	Ile	Tyr	Pro	Lys	Asn	Val	Val	Thr	Asp	Glu	Pro	Lys	Thr
		195					200					205			
Asp	Lys	Asp	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Gln	Asp	Asp	Ala	Gly	Tyr	Thr	Ile
		210				215					220				
Gly	Glu	Glu	Phe	Lys	Trp	Phe	Leu	Lys	Ser	Thr	Ile	Pro	Ala	Asn	Leu
225					230					235					240
Gly	Asp	Tyr	Glu	Lys	Phe	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Phe	Ala	Asp	Gly	Leu
				245					250					255	
Thr	Tyr	Lys	Ser	Val	Gly	Lys	Ile	Lys	Ile	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Asn
			260					265					270		
Arg	Asp	Glu	His	Tyr	Thr	Ile	Asp	Glu	Pro	Thr	Val	Asp	Asn	Gln	Asn
		275					280						285		
Thr	Leu	Lys	Ile	Thr	Phe	Lys	Pro	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile	Ala	Glu
						295						300			
Leu	Leu	Lys	Gly	Met	Thr	Leu	Val	Lys	Asn	Gln	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys
305					310					315					320
Ala	Thr	Ala	Asn	Thr	Asp	Asp	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Ile	Pro	Val	Ala
				325					330					335	
Ser	Thr	Ile	Asn	Glu	Lys	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Thr
			340					345					350		
Phe	Glu	Leu	Gln	Tyr	Asp	His	Thr	Pro	Asp	Lys	Ala	Asp	Asn	Pro	Lys
		355					360					365			
Pro	Ser	Asn	Pro	Pro	Arg	Lys	Pro	Glu	Val	His	Thr	Gly	Gly	Lys	Arg
		370				375						380			
Phe	Val	Lys	Lys	Asp	Ser	Thr	Glu	Thr	Gln	Thr	Leu	Gly	Gly	Ala	Glu
385					390						395				400

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

ES 2 370 281 T3

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

Lys Arg Tyr Lys Val Lys Thr Asp Ile Ser Val Asp Glu Leu Lys Lys
 100 105 110
 Leu Thr Thr Val Glu Ala Ala Asp Ala Lys Val Gly Thr Ile Leu Glu
 115 120 125
 Glu Gly Val Ser Leu Pro Gln Lys Thr Asn Ala Gln Gly Leu Val Val
 130 135 140
 Asp Ala Leu Asp Ser Lys Ser Asn Val Arg Tyr Leu Tyr Val Glu Asp
 145 150 155 160
 Leu Lys Asn Ser Pro Ser Asn Ile Thr Lys Ala Tyr Ala Val Pro Phe
 165 170 175
 Val Leu Glu Leu Pro Val Ala Asn Ser Thr Gly Thr Gly Phe Leu Ser
 180 185 190
 Glu Ile Asn Ile Tyr Pro Lys Asn Val Val Thr Asp Glu Pro Lys Thr
 195 200 205
 Asp Lys Asp Val Lys Lys Leu Gly Gln Asp Asp Ala Gly Tyr Thr Ile
 210 215 220
 Gly Glu Glu Phe Lys Trp Phe Leu Lys Ser Thr Ile Pro Ala Asn Leu
 225 230 235 240
 Gly Asp Tyr Glu Lys Phe Glu Ile Thr Asp Lys Phe Ala Asp Gly Leu
 245 250 255
 Thr Tyr Lys Ser Val Gly Lys Ile Lys Ile Gly Ser Lys Thr Leu Asn
 260 265 270
 Arg Asp Glu His Tyr Thr Ile Asp Glu Pro Thr Val Asp Asn Gln Asn
 275 280 285
 Thr Leu Lys Ile Thr Phe Lys Pro Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu
 290 295 300
 Leu Leu Lys Gly Met Thr Leu Val Lys Asn Gln Asp Ala Leu Asp Lys
 305 310 315 320
 Ala Thr Ala Asn Thr Asp Asp Ala Ala Phe Leu Glu Ile Pro Val Ala
 325 330 335
 Ser Thr Ile Asn Glu Lys Ala Val Leu Gly Lys Ala Ile Glu Asn Thr
 340 345 350
 Phe Glu Leu Gln Tyr Asp His Thr Pro Asp Lys Ala Asp Asn Pro Lys
 355 360 365
 Pro Ser Asn Pro Pro Arg Lys Pro Glu Val His Thr Gly Gly Lys Arg
 370 375 380
 Phe Val Lys Lys Asp Ser Thr Glu Thr Gln Thr Leu Gly Gly Ala Glu
 385 390 395 400
 Phe Asp Leu Leu Ala Ser Asp Gly Thr Ala Val Lys Trp Thr Asp Ala
 405 410 415
 Leu Ile Lys Ala Asn Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Ala Gly Glu Ala Val
 420 425 430
 Thr Gly Gln Pro Ile Lys Leu Lys Ser His Thr Asp Gly Thr Phe Glu
 435 440 445
 Ile Lys Gly Leu Ala Tyr Ala Val Asp Ala Asn Ala Glu Gly Thr Ala
 450 455 460
 Val Thr Tyr Lys Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro Glu Gly Tyr Val Ile
 465 470 475 480
 Pro Asp Lys Glu Ile Glu Phe Thr Val Ser Gln Thr Ser Tyr Asn Thr
 485 490 495
 Lys Pro Thr Asp Ile Thr Val Asp Ser Ala Asp Ala Thr Pro Asp Thr
 500 505 510
 Ile Lys Asn Asn Lys Arg Pro Ser Ile Pro Asn Thr Gly
 515 520 525

<210>5

<211>5

<212> PRT

<213> Streptococcus Agalactiae

<400> 5

Ile Pro Asn Thr Gly
1 5

5 <210>6

<211>520

<212> PRT

<213> Streptococcus Agalactiae

10 <400> 6

Met Lys Leu Ser Lys Lys Leu Leu Phe Ser Ala Ala Val Leu Thr Met
 1 5 10 15
 Val Ala Gly Ser Thr Val Glu Pro Val Ala Gln Phe Ala Thr Gly Met
 20 25 30
 Ser Ile Val Arg Ala Ala Glu Val Ser Gln Glu Arg Pro Ala Lys Thr
 35 40 45
 Thr Val Asn Ile Tyr Lys Leu Gln Ala Asp Ser Tyr Lys Ser Glu Ile
 50 55 60
 Thr Ser Asn Gly Gly Ile Glu Asn Lys Asp Gly Glu Val Ile Ser Asn
 65 70 75 80
 Tyr Ala Lys Leu Gly Asp Asn Val Lys Gly Leu Gln Gly Val Gln Phe
 85 90 95
 Lys Arg Tyr Lys Val Lys Thr Asp Ile Ser Val Asp Glu Leu Lys Lys
 100 105 110
 Leu Thr Thr Val Glu Ala Ala Asp Ala Lys Val Gly Thr Ile Leu Glu
 115 120 125
 Glu Gly Val Ser Leu Pro Gln Lys Thr Asn Ala Gln Gly Leu Val Val
 130 135 140
 Asp Ala Leu Asp Ser Lys Ser Asn Val Arg Tyr Leu Tyr Val Glu Asp
 145 150 155 160
 Leu Lys Asn Ser Pro Ser Asn Ile Thr Lys Ala Tyr Ala Val Pro Phe
 165 170 175
 Val Leu Glu Leu Pro Val Ala Asn Ser Thr Gly Thr Gly Phe Leu Ser
 180 185 190
 Glu Ile Asn Ile Tyr Pro Lys Asn Val Val Thr Asp Glu Pro Lys Thr
 195 200 205
 Asp Lys Asp Val Lys Lys Leu Gly Gln Asp Asp Ala Gly Tyr Thr Ile
 210 215 220
 Gly Glu Glu Phe Lys Trp Phe Leu Lys Ser Thr Ile Pro Ala Asn Leu
 225 230 235 240
 Gly Asp Tyr Glu Lys Phe Glu Ile Thr Asp Lys Phe Ala Asp Gly Leu
 245 250 255
 Thr Tyr Lys Ser Val Gly Lys Ile Lys Ile Gly Ser Lys Thr Leu Asn
 260 265 270
 Arg Asp Glu His Tyr Thr Ile Asp Glu Pro Thr Val Asp Asn Gln Asn
 275 280 285
 Thr Leu Lys Ile Thr Phe Lys Pro Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu
 290 295 300
 Leu Leu Lys Gly Met Thr Leu Val Lys Asn Gln Asp Ala Leu Asp Lys
 305 310 315 320
 Ala Thr Ala Asn Thr Asp Asp Ala Ala Phe Leu Glu Ile Pro Val Ala
 325 330 335

Ser Thr Ile Asn Glu Lys Ala Val Leu Gly Lys Ala Ile Glu Asn Thr
 340 345 350
 Phe Glu Leu Gln Tyr Asp His Thr Pro Asp Lys Ala Asp Asn Pro Lys
 355 360 365
 Pro Ser Asn Pro Pro Arg Lys Pro Glu Val His Thr Gly Gly Lys Arg
 370 375 380
 Phe Val Lys Lys Asp Ser Thr Glu Thr Gln Thr Leu Gly Gly Ala Glu
 385 390 395 400
 Phe Asp Leu Leu Ala Ser Asp Gly Thr Ala Val Lys Trp Thr Asp Ala
 405 410 415
 Leu Ile Lys Ala Asn Thr Asn Lys Asn Tyr Ile Ala Gly Glu Ala Val
 420 425 430
 Thr Gly Gln Pro Ile Lys Leu Lys Ser His Thr Asp Gly Thr Phe Glu
 435 440 445
 Ile Lys Gly Leu Ala Tyr Ala Val Asp Ala Asn Ala Glu Gly Thr Ala
 450 455 460
 Val Thr Tyr Lys Leu Lys Glu Thr Lys Ala Pro Glu Gly Tyr Val Ile
 465 470 475 480
 Pro Asp Lys Glu Ile Glu Phe Thr Val Ser Gln Thr Ser Tyr Asn Thr
 485 490 495
 Lys Pro Thr Asp Ile Thr Val Asp Ser Ala Asp Ala Thr Pro Asp Thr
 500 505 510
 Ile Lys Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 515 520

<210>7

<211>483

<212> PRT

5 <213>-Streptococcus Agalactiae

<400> 7

ES 2 370 281 T3

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

	195					200						205				
Phe	Glu	Ile	Thr	Asp	Lys	Phe	Ala	Asp	Gly	Leu	Thr	Tyr	Lys	Ser	Val	
	210					215						220				
Gly	Lys	Ile	Lys	Ile	Gly	Ser	Lys	Thr	Leu	Asn	Arg	Asp	Glu	His	Tyr	
225					230					235					240	
Thr	Ile	Asp	Glu	Pro	Thr	Val	Asp	Asn	Gln	Asn	Thr	Leu	Lys	Ile	Thr	
				245					250					255		
Phe	Lys	Pro	Glu	Lys	Phe	Lys	Glu	Ile	Ala	Glu	Leu	Leu	Lys	Gly	Met	
			260					265						270		
Thr	Leu	Val	Lys	Asn	Gln	Asp	Ala	Leu	Asp	Lys	Ala	Thr	Ala	Asn	Thr	
		275					280						285			
Asp	Asp	Ala	Ala	Phe	Leu	Glu	Ile	Pro	Val	Ala	Ser	Thr	Ile	Asn	Glu	
	290					295					300					
Lys	Ala	Val	Leu	Gly	Lys	Ala	Ile	Glu	Asn	Thr	Phe	Glu	Leu	Gln	Tyr	
305					310					315					320	
Asp	His	Thr	Pro	Asp	Lys	Ala	Asp	Asn	Pro	Lys	Pro	Ser	Asn	Pro	Pro	
				325					330					335		
Arg	Lys	Pro	Glu	Val	His	Thr	Gly	Gly	Lys	Arg	Phe	Val	Lys	Lys	Asp	
			340					345						350		
Ser	Thr	Glu	Thr	Gln	Thr	Leu	Gly	Gly	Ala	Glu	Phe	Asp	Leu	Leu	Ala	
		355					360					365				
Ser	Asp	Gly	Thr	Ala	Val	Lys	Trp	Thr	Asp	Ala	Leu	Ile	Lys	Ala	Asn	
	370					375					380					
Thr	Asn	Lys	Asn	Tyr	Ile	Ala	Gly	Glu	Ala	Val	Thr	Gly	Gln	Pro	Ile	
385					390					395					400	
Lys	Leu	Lys	Ser	His	Thr	Asp	Gly	Thr	Phe	Glu	Ile	Lys	Gly	Leu	Ala	
				405					410					415		
Tyr	Ala	Val	Asp	Ala	Asn	Ala	Glu	Gly	Thr	Ala	Val	Thr	Tyr	Lys	Leu	
			420					425					430			
Lys	Glu	Thr	Lys	Ala	Pro	Glu	Gly	Tyr	Val	Ile	Pro	Asp	Lys	Glu	Ile	
		435					440					445				
Glu	Phe	Thr	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Tyr	Asn	Thr	Lys	Pro	Thr	Asp	Ile	
	450					455					460					
Thr	Val	Asp	Ser	Ala	Asp	Ala	Thr	Pro	Asp	Thr	Ile	Lys	Asn	Asn	Lys	
465					470					475					480	
Arg	Pro	Ser														

<210>8

<211> 271

<212> PRT

5 <213> Streptococcus Agalactiae

<400> 8

ES 2 370 281 T3

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

Pro Gln Lys Thr Asn Ala Gln Gly Leu Val Val Asp Ala Leu Asp Ser
 100 105 110
 Lys Ser Asn Val Arg Tyr Leu Tyr Val Glu Asp Leu Lys Asn Ser Pro
 115 120 125
 Ser Asn Ile Thr Lys Ala Tyr Ala Val Pro Phe Val Leu Glu Leu Pro
 130 135 140
 Val Ala Asn Ser Thr Gly Thr Gly Phe Leu Ser Glu Ile Asn Ile Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Asn Val Val Thr Asp Glu Pro Lys Thr Asp Lys Asp Val Lys
 165 170 175
 Lys Leu Gly Gln Asp Asp Ala Gly Tyr Thr Ile Gly Glu Glu Phe Lys
 180 185 190
 Trp Phe Leu Lys Ser Thr Ile Pro Ala Asn Leu Gly Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 Phe Glu Ile Thr Asp Lys Phe Ala Asp Gly Leu Thr Tyr Lys Ser Val
 210 215 220
 Gly Lys Ile Lys Ile Gly Ser Lys Thr Leu Asn Arg Asp Glu His Tyr
 225 230 235 240
 Thr Ile Asp Glu Pro Thr Val Asp Asn Gln Asn Thr Leu Lys Ile Thr
 245 250 255
 Phe Lys Pro Glu Lys Phe Lys Glu Ile Ala Glu Leu Leu Lys Gly
 260 265 270

<210>9

<211> 2118

<212> ADN

5 <213> Streptococcus Agalactiae

<400> 9

ttaagcttcc ttgattggc gtcttttcat gataactact gctccaagca taatgcttaa 60
 accaataatt gtgaaaagaa ttgtaccaat accacctgtt tgtgggattg ttaccttttt 120
 attttctaca cgtgtcgcac ctttttggtt gctgttagca acgtagtcaa tgttaccacc 180
 tgttatgtat gacccttgat taactacaaa cttaatatta cctgccaact tagcaaatcc 240
 tgctggagca agtgtttctt caagggtgta agtaccgtct gcaagacctg taacttcaaa 300
 ttgacctga tcgtttgaag tgtaggtaat ggctctagcc ttatctgtta tccactcata 360
 agctgtacga gcctcaatga aggctgcac gtaatctgct tgtttagttt tgataagttc 420
 ttttgacgta attccttttt caoctttttg gtctgttgca gacaacttgt tataagcagc 480
 gatagcttca tctaaagota ttttcttagc agctaaagt ttttgacct ctgattgatc 540
 tgctttaaga gcaaggatt tacctgctga gtttttcaca acgaattgtg caccagccaa 600
 acggtcacct tgttcattag ttttgacaaa tttcttacca tgagtttcaa cttttggttc 660
 agttgggttc aatgggtgtg ggttatcaga atctttggta ttggtaatgg ttactttacc 720
 attttctaga tttattgcac ttccgtaacc agaaacacgt tctgagatca tgtatgattt 780
 gtttctaga ccagtgaatt taccogagaa gttaccagat acttcaaatt tgataccatt 840
 tccaaggctg attgtacct tagatgttt tgtcaatgat actgaagcaa cagttttacc 900
 tttatcttcc aatgtgtaaa caacgtttac accatcaggt gcaattccgt cagaccaagt 960
 tttagcaact gttacttcac cctttgaagg tgtaacagga agttcagtca agtctttacc 1020
 tggtttgta ccatacgaca atttgatatc attggattct ggattatcaa taattgcttg 1080
 accattaaca gtagcactat aagtcaatgt aaattcaata tcagctgttt tagctgcttt 1140
 ttccaatttg cccaatccat cagctgtgaa ttttaatgtg aaaccacggg catcaatgct 1200
 aagttcatag tctgtatcct tagcaaaagt ttctgtagtt cctgaagctt taaggctaac 1260
 agttgaacc attgtcaaac catttgacat tatactctgc caaaccaagt tttcgtattt 1320
 agaaccttg tgaatttttg ttttaacttc ataaggaaca actttaccga tttcagcagt 1380
 agcagttgct ttgtcacgtg cataattacc ataatttgcg ccagctgtca aaagtctatt 1440
 aacatctgtc aatgctgtca aatcgtttgt ttttagcaaag tttttatcaa tttctggttt 1500
 ttcttcagtg ttctttggat aaacatgggc atcagcaaca acaccatctt catttaccaa 1560
 tggagagtg atgttaactg gaaccgcttt tgaagcagcc aggagggaaac cattattggt 1620

gtaagtagat tttgatttaa cttcaacaat tttaaactcg cctttcaatc ctttgggtgt 1680
 gaaaacaagt ccagtatctc cctctgggtg caatccagac acggcctcat caatatttac 1740
 tgttatttca ggagtaccat ctttattaat taaggctggt gtaatttgt taccttcttt 1800
 tgccttaaca tattgcactt taccactttt atcttcttcc aaagctaaag caaagaacgc 1860
 accttcgatt tcttttagatc cctcgccaaa gtaaccagca aggtcagaaa tagctccacc 1920
 tttgtagtct tttccggtta gacctgtagt tcctgggaag ttacttttgt taagatttga 1980
 ttcggtttgc aaaatcttgt gcaaagtcac tgtattagtt gttgcttcat ccgcaaacgc 2040
 tggtgcaact gagagcaatg acgttaaagt cagtaacaat gccgagaaca ttgcaaaata 2100
 tttgttgatt cttttcat 2118

<210> 10

<211>705

<212> PRT

5 <213> Streptococcus Agalactiae

<400> 10

Met Lys Arg Ile Asn Lys Tyr Phe Ala Met Phe Ser Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Thr Leu Thr Ser Leu Leu Ser Val Ala Pro Ala Phe Ala Asp Glu Ala
 20 25 30
 Thr Thr Asn Thr Val Thr Leu His Lys Ile Leu Gln Thr Glu Ser Asn
 35 40 45
 Leu Asn Lys Ser Asn Phe Pro Gly Thr Thr Gly Leu Asn Gly Lys Asp
 50 55 60
 Tyr Lys Gly Gly Ala Ile Ser Asp Leu Ala Gly Tyr Phe Gly Glu Gly
 65 70 75 80
 Ser Lys Glu Ile Glu Gly Ala Phe Phe Ala Leu Ala Leu Lys Glu Asp
 85 90 95
 Lys Ser Gly Lys Val Gln Tyr Val Lys Ala Lys Glu Gly Asn Lys Leu
 100 105 110
 Thr Pro Ala Leu Ile Asn Lys Asp Gly Thr Pro Glu Ile Thr Val Asn
 115 120 125
 Ile Asp Glu Ala Val Ser Gly Leu Thr Pro Glu Gly Asp Thr Gly Leu
 130 135 140
 Val Phe Asn Thr Lys Gly Leu Lys Gly Glu Phe Lys Ile Val Glu Val
 145 150 155 160
 Lys Ser Lys Ser Thr Tyr Asn Asn Asn Gly Ser Leu Leu Ala Ala Ser
 165 170 175
 Lys Ala Val Pro Val Asn Ile Thr Leu Pro Leu Val Asn Glu Asp Gly
 180 185 190
 Val Val Ala Asp Ala His Val Tyr Pro Lys Asn Thr Glu Glu Lys Pro
 195 200 205
 Glu Ile Asp Lys Asn Phe Ala Lys Thr Asn Asp Leu Thr Ala Leu Thr
 210 215 220
 Asp Val Asn Arg Leu Leu Thr Ala Gly Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Ala
 225 230 235 240
 Arg Asp Lys Ala Thr Ala Thr Ala Glu Ile Gly Lys Val Val Pro Tyr
 245 250 255
 Glu Val Lys Thr Lys Ile His Lys Gly Ser Lys Tyr Glu Asn Leu Val
 260 265 270
 Trp Thr Asp Ile Met Ser Asn Gly Leu Thr Met Gly Ser Thr Val Ser
 275 280 285
 Leu Lys Ala Ser Gly Thr Thr Glu Thr Phe Ala Lys Asp Thr Asp Tyr
 290 295 300
 Glu Leu Ser Ile Asp Ala Arg Gly Phe Thr Leu Lys Phe Thr Ala Asp
 305 310 315 320
 Gly Leu Gly Lys Leu Glu Lys Ala Ala Lys Thr Ala Asp Ile Glu Phe

				325					330					335					
Thr	Leu	Thr	Tyr	Ser	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	Gln	Ala	Ile	Ile	Asp	Asn				
			340					345					350						
Pro	Glu	Ser	Asn	Asp	Ile	Lys	Leu	Ser	Tyr	Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Lys				
		355					360					365							
Asp	Leu	Thr	Glu	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Ser	Lys	Gly	Glu	Val	Thr	Val				
	370					375					380								
Ala	Lys	Thr	Trp	Ser	Asp	Gly	Ile	Ala	Pro	Asp	Gly	Val	Asn	Val	Val				
385					390					395					400				
Tyr	Thr	Leu	Lys	Asp	Lys	Asp	Lys	Thr	Val	Ala	Ser	Val	Ser	Leu	Thr				
				405					410					415					
Lys	Thr	Ser	Lys	Gly	Thr	Ile	Asp	Leu	Gly	Asn	Gly	Ile	Lys	Phe	Glu				
			420					425					430						
Val	Ser	Gly	Asn	Phe	Ser	Gly	Lys	Phe	Thr	Gly	Leu	Glu	Asn	Lys	Ser				
		435					440					445							
Tyr	Met	Ile	Ser	Glu	Arg	Val	Ser	Gly	Tyr	Gly	Ser	Ala	Ile	Asn	Leu				
	450					455					460								
Glu	Asn	Gly	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Asn	Thr	Lys	Asp	Ser	Asp	Asn	Pro				
465					470					475					480				
Thr	Pro	Leu	Asn	Pro	Thr	Glu	Pro	Lys	Val	Glu	Thr	His	Gly	Lys	Lys				
			485						490					495					
Phe	Val	Lys	Thr	Asn	Glu	Gln	Gly	Asp	Arg	Leu	Ala	Gly	Ala	Gln	Phe				
			500					505					510						
Val	Val	Lys	Asn	Ser	Ala	Gly	Lys	Tyr	Leu	Ala	Leu	Lys	Ala	Asp	Gln				
		515						520				525							
Ser	Glu	Gly	Gln	Lys	Thr	Leu	Ala	Ala	Lys	Lys	Ile	Ala	Leu	Asp	Glu				
	530					535					540								
Ala	Ile	Ala	Ala	Tyr	Asn	Lys	Leu	Ser	Ala	Thr	Asp	Gln	Lys	Gly	Glu				
545					550					555					560				
Lys	Gly	Ile	Thr	Ala	Lys	Glu	Leu	Ile	Lys	Thr	Lys	Gln	Ala	Asp	Tyr				
				565					570					575					
Asp	Ala	Ala	Phe	Ile	Glu	Ala	Arg	Thr	Ala	Tyr	Glu	Trp	Ile	Thr	Asp				
			580					585					590						
Lys	Ala	Arg	Ala	Ile	Thr	Tyr	Thr	Ser	Asn	Asp	Gln	Gly	Gln	Phe	Glu				
		595					600					605							
Val	Thr	Gly	Leu	Ala	Asp	Gly	Thr	Tyr	Asn	Leu	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala				
	610					615					620								
Pro	Ala	Gly	Phe	Ala	Lys	Leu	Ala	Gly	Asn	Ile	Lys	Phe	Val	Val	Asn				
625					630					635					640				
Gln	Gly	Ser	Tyr	Ile	Thr	Gly	Gly	Asn	Ile	Asp	Tyr	Val	Ala	Asn	Ser				
				645					650					655					
Asn	Gln	Lys	Asp	Ala	Thr	Arg	Val	Glu	Asn	Lys	Lys	Val	Thr	Ile	Pro				
			660					665					670						
Gln	Thr	Gly	Gly	Ile	Gly	Thr	Ile	Leu	Phe	Thr	Ile	Ile	Gly	Leu	Ser				
		675					680					685							
Ile	Met	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ile	Met	Lys	Arg	Arg	Gln	Ser	Lys	Glu				
	690					695					700								
Ala																			
705																			

<210> 11

<211> 2025

5 <212> ADN

<213> Streptococcus Agalactiae

<400> 11

```

atgaaaaaaaa tcaacaaatg tcttacaatg ttctcgacac tgctattgat cttaacgtca 60
ctattctcag ttgcaccagc gtttgcggac gacgcaacaa ctgatactgt gaccttgcac 120
aagattgtca tgccacaagc tgcatttgat aactttactg aaggtaacaa aggtaagaat 180
gatagcgatt atgttggtaa acaaattaat gacottnaat cttattttgg ctcaaccgat 240
gctaaagaaa tcaaggggtc tttctttggt ttcaaaaatg aaactggtag aaaattcatt 300
actgaaaatg gtaaggaagt cgatactttg gaagctaaag atgctgaagg tgggtgctgtt 360
ctttcagggc taacaaaaga caatggtttt gtttttaaca ctgctaagt aaaggaatt 420
taccaaatcg ttgaattgaa agaaaaatca aactacgata acaacggttc tatcttggct 480
gattcaaaag cagttccagt taaaatcact ctgccattgg taaacaacca aggtgttgtt 540
aaagatgctc acatztatcc aaagaatact gaaacaaaac cacaagtaga taagaacttt 600
gcagataaag atcttgatta tactgacaac cgaaaagaca aagggtgtgt agactataag 660
gttgggtgaca aaaaagaata catagttgga acaaaaattc ttaaaggctc ctagctataag 720
aaactgggtt ggactgatag catgactaaa ggtttgacgt tcaacaacaa cgtaaagta 780
acattgggatg gtgaagattt tctgtttta aactacaaac tcgtaacaga tgaccaaggt 840
ttcctgtctg ccttgaatgc aacaggtctt gcagcagtag cagcagctgc aaaagacaaa 900
gatgttgaaa tcaagatcac ttactcagct acggtgaacg gctccactac tgttgaaatt 960
ccagaaacca atgatgttaa attggactat ggtaataacc caacggaaga aagtgaacca 1020
caagaaggta ctccagctaa ccaagaaatt aaagtcatta aagactgggc agtagatgg 1080
acaattactg atgctaattg tgcagttaaa gctatcttta ccttgcaaga aaaacaaacg 1140
gatggtacat ggggtgaacg tgccttcacac gaagcaacaa aaccatcacg ctttgaacat 1200
actttcacag gtttggataa tgctaaaact taccgcgttg tcgaacgtgt tagcggetac 1260
actccagaat acgtatcatt taaaaatggt gttgtgacta tcaagaacaa caaaaactca 1320
aatgatccaa ctccaatcaa cccatcagaa ccaaaagtgg tgacttatgg acgtaaattt 1380
gtgaaaacaa atcaagctaa cactgaacgc ttggcaggag ctaccttctt cgtaaagaa 1440
gaaggcaaat acttggcacg taaagcaggt gcagcaactg ctgaagcaaa ggcagctgta 1500
aaaactgcta aactagcatt ggatgaagct gttaaagctt ataacgactt gactaaagaa 1560
aaacaagaag gccaaagaag taaaacagca ttggctactg ttgatcaaaa acaaaaagct 1620
tacaatgacg cttttgttaa agctaactac tcatatgaat gggttgcaga taaaaaggct 1680
gataatggtt ttaaatgtat ctctaacgc ggtggtcaat ttgaaattac tggtttggat 1740
aaaggcactt atggcttggg agaaactcaa gcaccagcag gttatgcgac attgtcaggt 1800
gatgtaaaact ttgaagtaac tgccacatca tatagcaaaag gggctacaac tgacatcgca 1860
tatgataaag gctctgtaaa aaaagatgcc caacaagttc aaaacaaaaa agtaaccatc 1920
ccacaaacag gtggatttgg tacaattctt ttcacaatta ttggtttaag cattatgctt 1980
ggagcagtag ttatcatgaa aaaacgtcaa tcagaggaag cttaa 2025

```

5

<210> 12

<211> 674

<212> PRT

<213> Streptococcus Agalactiae

10

<400> 12

ES 2 370 281 T3

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

Gly Phe Val Phe Asn Thr Ala Lys Leu Lys Gly Ile Tyr Gln Ile Val
 130 135 140
 Glu Leu Lys Glu Lys Ser Asn Tyr Asp Asn Asn Gly Ser Ile Leu Ala
 145 150 155 160
 Asp Ser Lys Ala Val Pro Val Lys Ile Thr Leu Pro Leu Val Asn Asn
 165 170 175
 Gln Gly Val Val Lys Asp Ala His Ile Tyr Pro Lys Asn Thr Glu Thr
 180 185 190
 Lys Pro Gln Val Asp Lys Asn Phe Ala Asp Lys Asp Leu Asp Tyr Thr
 195 200 205
 Asp Asn Arg Lys Asp Lys Gly Val Val Ser Ala Thr Val Gly Asp Lys
 210 215 220
 Lys Glu Tyr Ile Val Gly Thr Lys Ile Leu Lys Gly Ser Asp Tyr Lys
 225 230 235 240
 Lys Leu Val Trp Thr Asp Ser Met Thr Lys Gly Leu Thr Phe Asn Asn
 245 250 255
 Asn Val Lys Val Thr Leu Asp Gly Glu Asp Phe Pro Val Leu Asn Tyr
 260 265 270
 Lys Leu Val Thr Asp Asp Gln Gly Phe Arg Leu Ala Leu Asn Ala Thr
 275 280 285
 Gly Leu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Lys Asp Lys Asp Val Glu Ile
 290 295 300
 Lys Ile Thr Tyr Ser Ala Thr Val Asn Gly Ser Thr Thr Val Glu Ile
 305 310 315 320
 Pro Glu Thr Asn Asp Val Lys Leu Asp Tyr Gly Asn Asn Pro Thr Glu
 325 330 335
 Glu Ser Glu Pro Gln Glu Gly Thr Pro Ala Asn Gln Glu Ile Lys Val
 340 345 350
 Ile Lys Asp Trp Ala Val Asp Gly Thr Ile Thr Asp Ala Asn Val Ala
 355 360 365
 Val Lys Ala Ile Phe Thr Leu Gln Glu Lys Gln Thr Asp Gly Thr Trp
 370 375 380
 Val Asn Val Ala Ser His Glu Ala Thr Lys Pro Ser Arg Phe Glu His
 385 390 395 400
 Thr Phe Thr Gly Leu Asp Asn Ala Lys Thr Tyr Arg Val Val Glu Arg
 405 410 415
 Val Ser Gly Tyr Thr Pro Glu Tyr Val Ser Phe Lys Asn Gly Val Val
 420 425 430
 Thr Ile Lys Asn Asn Lys Asn Ser Asn Asp Pro Thr Pro Ile Asn Pro
 435 440 445
 Ser Glu Pro Lys Val Val Thr Tyr Gly Arg Lys Phe Val Lys Thr Asn
 450 455 460
 Gln Ala Asn Thr Glu Arg Leu Ala Gly Ala Thr Phe Leu Val Lys Lys
 465 470 475 480
 Glu Gly Lys Tyr Leu Ala Arg Lys Ala Gly Ala Ala Thr Ala Glu Ala
 485 490 495
 Lys Ala Ala Val Lys Thr Ala Lys Leu Ala Leu Asp Glu Ala Val Lys
 500 505 510
 Ala Tyr Asn Asp Leu Thr Lys Glu Lys Gln Glu Gly Gln Glu Gly Lys
 515 520 525
 Thr Ala Leu Ala Thr Val Asp Gln Lys Gln Lys Ala Tyr Asn Asp Ala
 530 535 540
 Phe Val Lys Ala Asn Tyr Ser Tyr Glu Trp Val Ala Asp Lys Lys Ala
 545 550 555 560
 Asp Asn Val Val Lys Leu Ile Ser Asn Ala Gly Gly Gln Phe Glu Ile
 565 570 575
 Thr Gly Leu Asp Lys Gly Thr Tyr Gly Leu Glu Glu Thr Gln Ala Pro

			580					585				590			
Ala	Gly	Tyr	Ala	Thr	Leu	Ser	Gly	Asp	Val	Asn	Phe	Glu	Val	Thr	Ala
			595				600					605			
Thr	Ser	Tyr	Ser	Lys	Gly	Ala	Thr	Thr	Asp	Ile	Ala	Tyr	Asp	Lys	Gly
			610				615					620			
Ser	Val	Lys	Lys	Asp	Ala	Gln	Gln	Val	Gln	Asn	Lys	Lys	Val	Thr	Ile
					630					635					640
Pro	Gln	Thr	Gly	Gly	Ile	Gly	Thr	Ile	Leu	Phe	Thr	Ile	Ile	Gly	Leu
				645						650				655	
Ser	Ile	Met	Leu	Gly	Ala	Val	Val	Ile	Met	Lys	Lys	Arg	Gln	Ser	Glu
			660					665					670		
Glu	Ala														

<210> 13

5 <211>5

<212> PRT

<213> Streptococcus Agalactiae

<400> 13

Ile Pro Gln Thr Gly
1 5

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una adhesina bacteriana aislada en el confórmero F, en la que la adhesina bacteriana puede generar una respuesta inmunitaria en un sujeto, en la que la adhesina bacteriana en el confórmero F no queda retenida por una columna de Q-sefarosa, y en la que la adhesina bacteriana es GBS80.
2. La adhesina bacteriana aislada de la reivindicación 1, en la que la adhesina bacteriana se produce de forma recombinante.
3. La adhesina bacteriana aislada de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en la que la adhesina bacteriana:
- 10 a) queda retenida por una columna de hidroxiapatita;
- b) se desplaza como una única banda con menor peso molecular aparente en SDS-PAGE en ausencia de desnaturalización por calor cuando se compara con la adhesina bacteriana después de la desnaturalización por calor;
- 15 c) es más resistente a la digestión por proteasas que la adhesina bacteriana en el confórmero A, en la que la adhesina bacteriana en el confórmero A queda retenida por una columna de Q-sefarosa; o
- d) se eluye desde una columna de cromatografía de exclusión por tamaño como un único pico monodisperso.
4. Un anticuerpo que se une a una adhesina bacteriana en el confórmero F de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, pero no a la adhesina bacteriana en el confórmero A, en el que la adhesina bacteriana en el confórmero A queda retenida por una columna de Q-sefarosa.
- 20 5. El anticuerpo de la reivindicación 4, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo completamente humano.
6. Una composición que comprende el anticuerpo de la reivindicación 4 o de la reivindicación 5.
7. Una composición que comprende una adhesina bacteriana de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y que comprende menos del 20% de la adhesina bacteriana en el confórmero A, en la que la adhesina bacteriana en el confórmero A queda retenida por una columna de Q-sefarosa.
- 25 8. Una composición que comprende al menos 1 o más partes de GBS80 en el confórmero F a 1 parte de GBS80 en el confórmero A, en la que la GBS80 en el confórmero F puede generar una respuesta inmunitaria en un sujeto, en la que GBS80 en el confórmero F no queda retenida por una columna de Q-sefarosa, y en la que GBS80 en el confórmero A queda retenida por un columna de Q-sefarosa.
- 30 9. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, siendo una composición inmunogénica, una composición de vacuna o una composición de diagnóstico.
10. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8 para su uso como producto farmacéutico.
11. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, para el tratamiento o la prevención de infección por GBS.
- 35 12. Un procedimiento de separación de una GBS80 en el confórmero F de una GBS80 en el confórmero A que comprende:
- a) proporcionar una muestra que contiene una mezcla de la GBS80 en el confórmero F y la GBS80 en el confórmero A;
- 40 b) separar la GBS80 en el confórmero F de la GBS80 en el confórmero A usando una tecnología de separación seleccionada del grupo que consiste en una tecnología de separación por intercambio aniónico, una tecnología de separación basada en hidroxiapatita y una tecnología de separación basada en el coeficiente de fricción,
- en el que la GBS80 en el confórmero F no queda retenida por una columna de Q-sefarosa y en el que la GBS80 en el confórmero A queda retenida por una columna de Q-sefarosa.
- 45 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la tecnología de separación basada en el coeficiente de fricción se selecciona del grupo que consiste en electroforesis, cromatografía de exclusión por tamaño, fraccionamiento campo-flujo, centrifugación por velocidad de sedimentación.

14. Un procedimiento para aislar el confórmero F de GBS80 que comprende aplicar una muestra que contiene una mezcla de confórmeros sobre una cromatografía de intercambio de iones, recuperar el flujo continuo y aislar el confórmero F con una etapa cromatográfica de hidroxapatita, en el que la GBS80 en el confórmero F no queda retenida por una columna de Q-sefarosa.

Figura 1: SDS-PAGE de isoformas purificadas de GBS 80

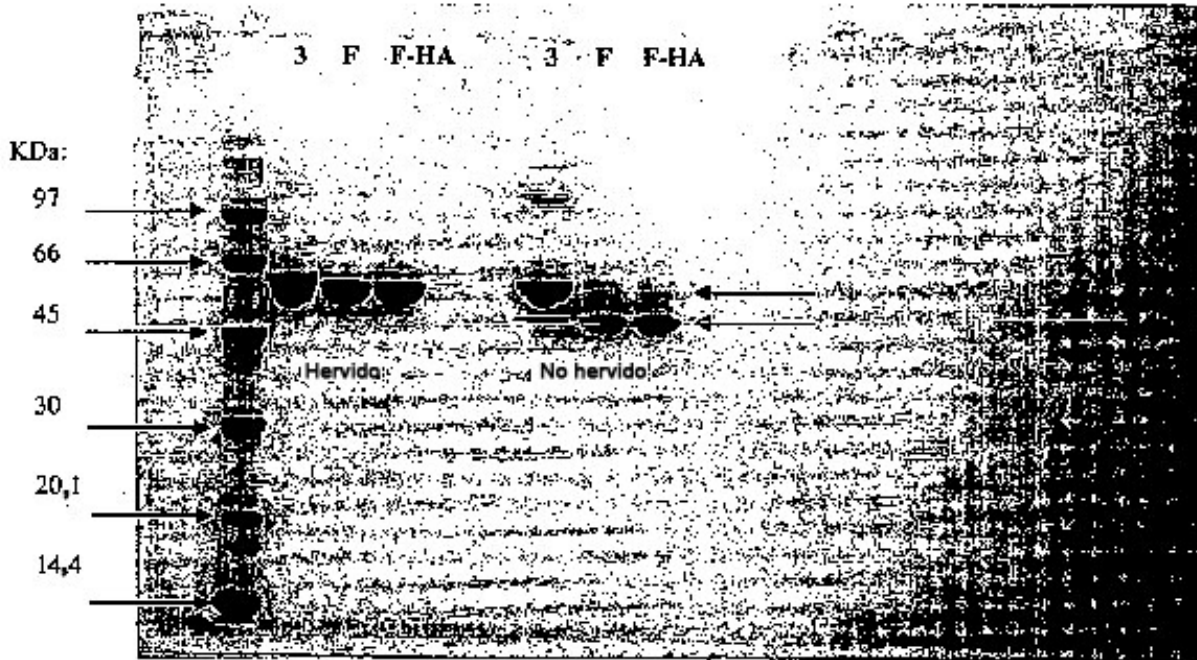


Figura 2: Filtración en gel analítica en un Superdex 200 10/30 de las mismas muestras con PBS como tampón y un flujo de 0,5 ml/min.

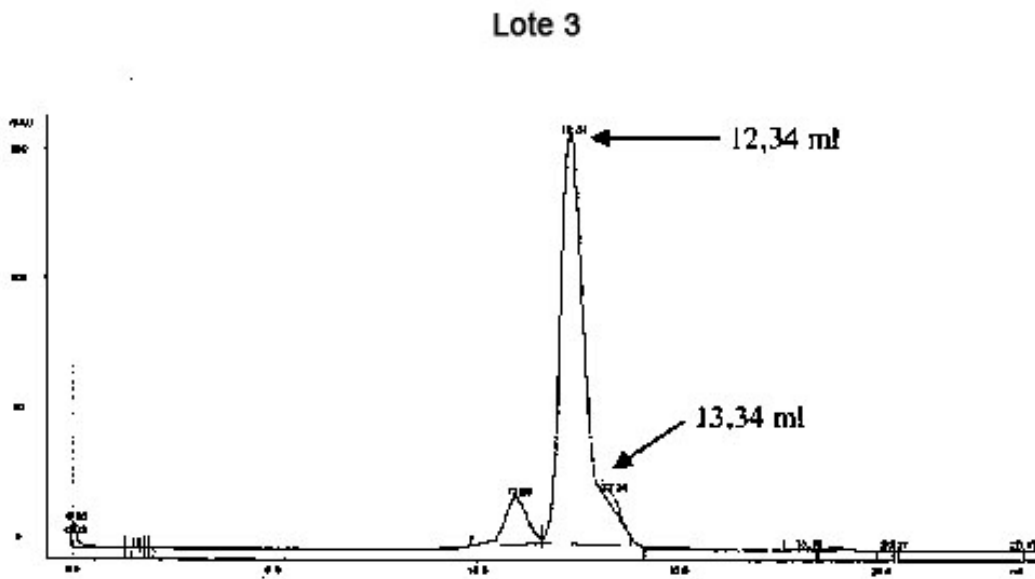
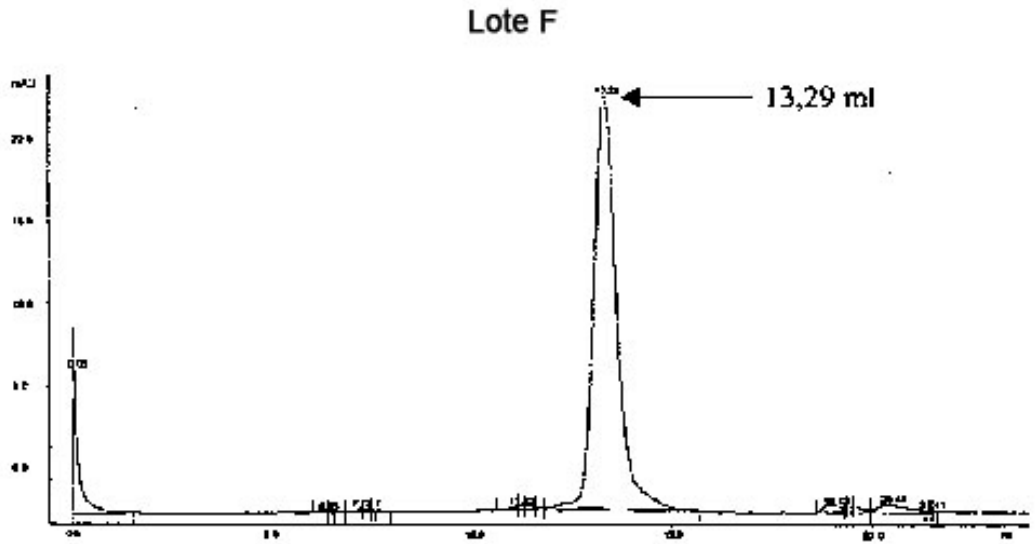


Figura 3: Filtración en gel analítica del lote 3 y del lote F a diferentes tiempos y pH.

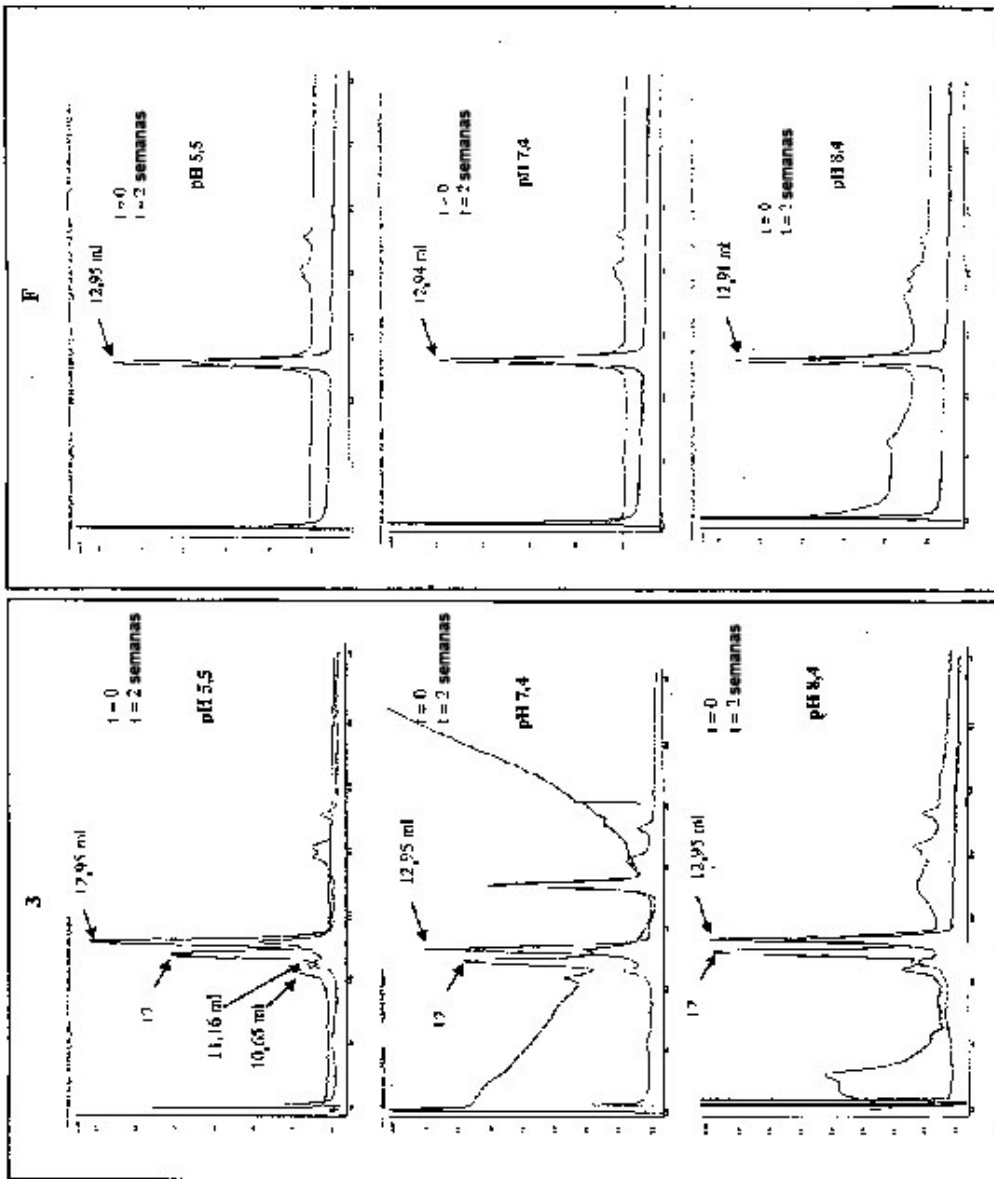


Figura 4a: Filtración en gel analítica de 5 lotes de GBS 80 diferentes

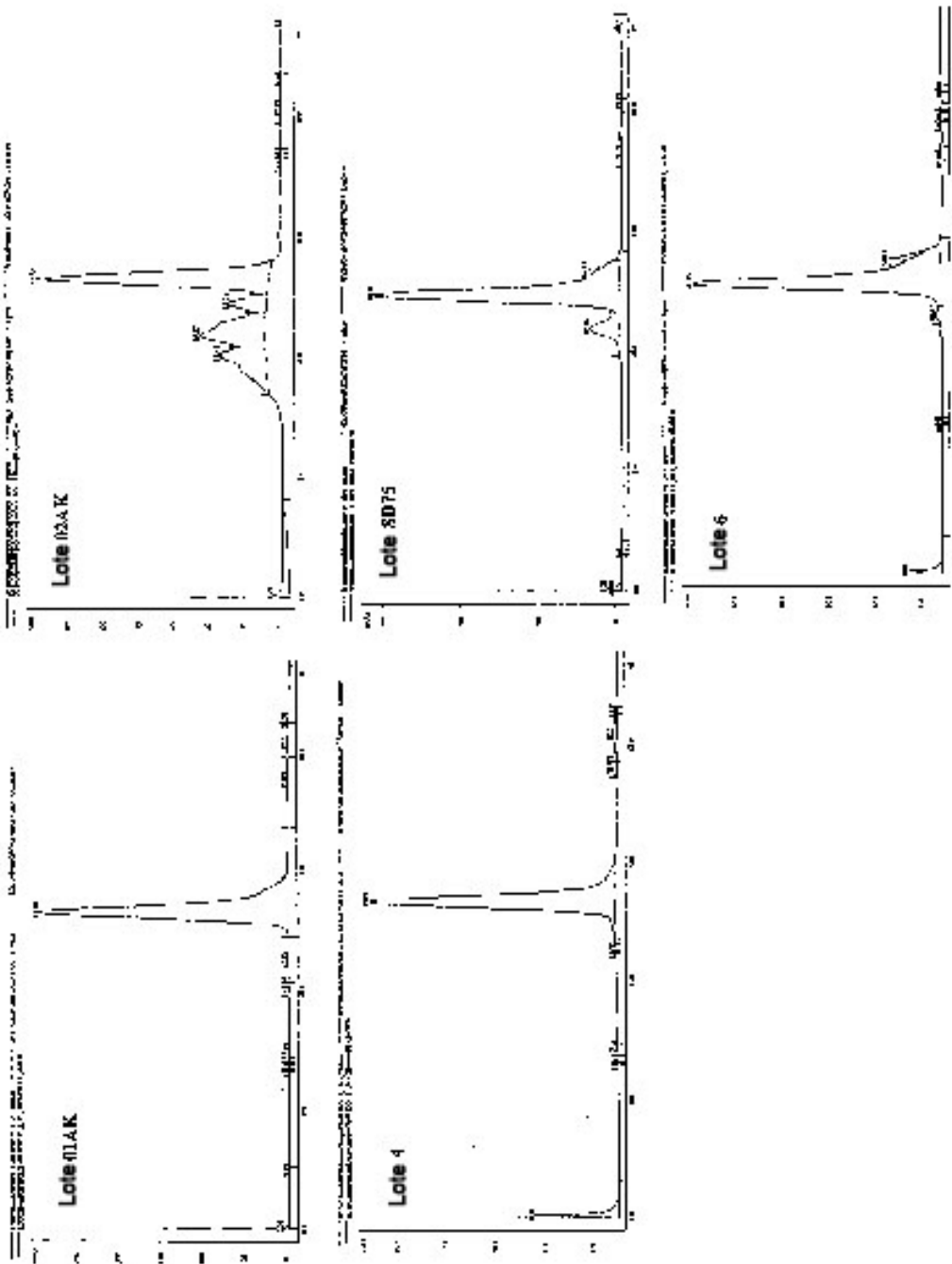
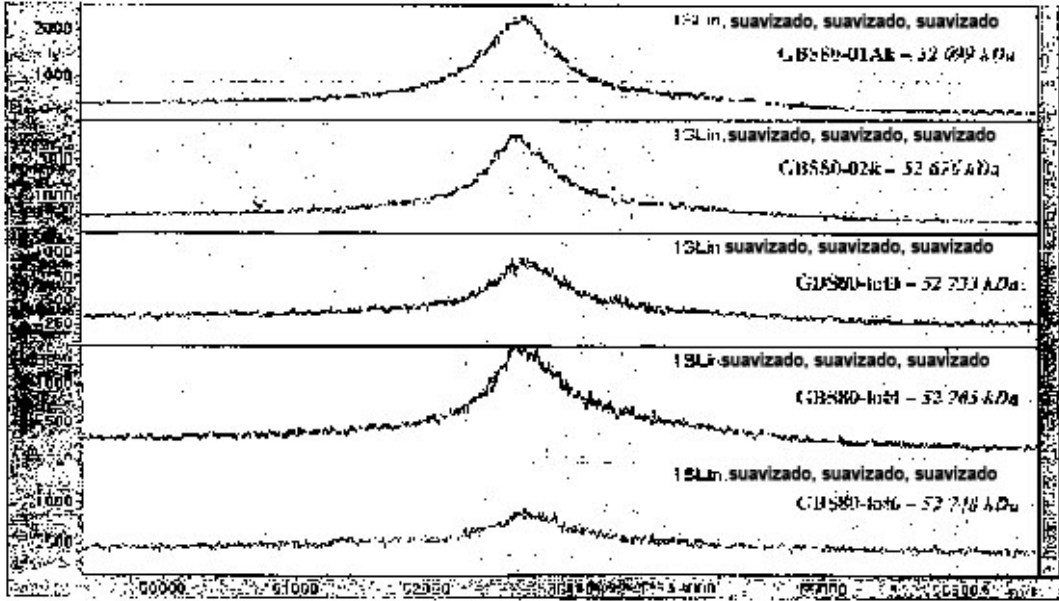


Figura 4b: Pesos moleculares de 5 lotes de GBS80 diferentes como se determina con espectrometría MALDI-TOF.



Lote	Confórmero principal	PM (kDa)
Lote 01AK	F	52699
Lote 02 K	A	52676
Lote 3	A	52733
Lote 4	F	52705
Lote 6	A	52748

Figura 5: SDS-PAGE después de la digestión con diferentes proteasas, con y sin desnaturalización con detergente (RapiGest SF).

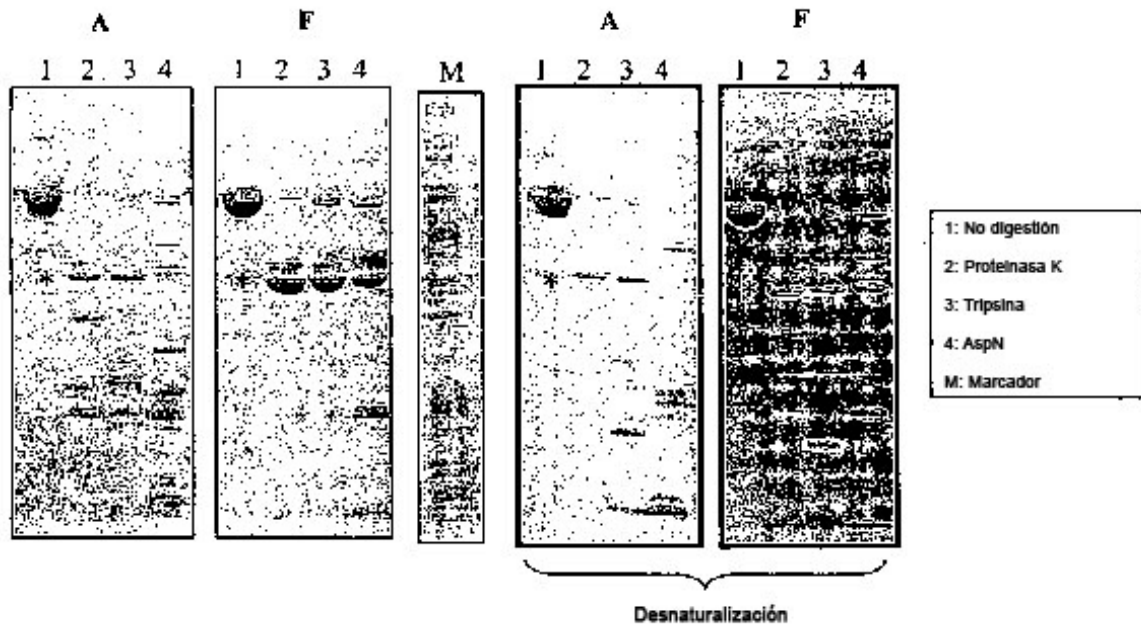


Figura 6: Resultados de inmunización materna activa

Lote		Protección			
		COHI		COHI 2	
		Vivos/tratados	%	Vivos/tratados	%
GBS 80	A	13/62	79	31/91	66
GBS 80	F	19/68	73	9/88	90
PBS		15/35	57	58/59	2

Exposición	CFU
160	1600