(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 277 362**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/31 (2006.01)
C12N 5/18 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 39/09 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **97946850 .1**
(86) Fecha de presentación : **30.10.1997**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0942983**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.1999**

(54) Título: **Antígenos y vacunas de *Streptococcus pneumoniae*.**

(30) Prioridad: **31.10.1996 US 29960 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **01.07.2007**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **01.07.2007**

(73) Titular/es: **HUMAN GENOME SCIENCES, Inc.**
14200 Shady Grove Road
Rockville, Maryland 20850, US

(72) Inventor/es: **Kunsch, Charles, A.;**
Choi, Gil, H.;
Johnson, L., Sydnor y
Hromockyj, Alex

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 277 362 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

Antígenos y vacunas de *Streptococcus pneumoniae*.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos antígenos de *Streptococcus pneumoniae* para la detección de *Streptococcus* y para la prevención o atenuación de enfermedades provocadas por *Streptococcus*. La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican polipéptidos antigénicos de *S. pneumoniae*. También se proporcionan polipéptidos antigénicos, tales como vectores, células hospedantes y métodos recombinantes para la producción de los mismos. Adicionalmente, la invención se refiere a métodos diagnósticos para la detección de expresión génica de *Streptococcus*.

Antecedentes de la invención

El *Streptococcus pneumoniae* ha sido uno de los microorganismos más ampliamente estudiados desde la primera vez que fue aislado en 1881. Fue el objetivo de muchas investigaciones que condujeron a importantes descubrimientos científicos. En 1928, Griffith observó que cuando se eliminaban con calor neumococos encapsulados y concomitantemente se inyectaban en ratones cepas vivas que constitutivamente carecían de cualquier cápsula, los no encapsulados pudieron convertirse en neumococos encapsulados con el mismo tipo capsular que la cepa eliminada con calor. Años después, se demostró que la naturaleza de este "principio de transformación", o portador de información genética, era ADN. (Avery, O.T., y col., *J. Exp. Med.*, 79: 137-157 (1944)).

A pesar del vasto número de publicaciones sobre *S. pneumoniae*, aún quedan sin resolver muchas cuestiones acerca de su virulencia, y dicho patógeno sigue siendo un importante agente causante de enfermedades humanas graves, especialmente la neumonía adquirida por comunidad. (Johnston, R.B., y col., *Rev. Infect. Dis.* 13 (Supl. 6): S509-517 (1991)). Además, en los países desarrollados, el neumococo es el responsable de la muerte de un gran número de niños de menos de 5 años a través de neumonía por neumococos. La incidencia de la enfermedad por neumococos es mayor en los niños con menos de 2 años y en la gente con más de 60 años de edad. Los neumococos son la segunda causa más frecuente (después del *Haemophilus influenzae* tipo b) de meningitis bacteriana y de otitis media en niños. Con la reciente introducción de vacunas conjugadas para el *H. influenzae* tipo b, la meningitis por neumococos probablemente sea cada vez más predominante. El *S. pneumoniae* es el agente etiológico más importante de la neumonía adquirida en comunidad en adultos y es la segunda causa más común de meningitis bacteriana detrás de la *Neisseria meningitidis*.

El antibiótico que se prescribe normalmente para tratar el *S. pneumoniae* es la bencilpenicilina, aunque ocasionalmente se produce resistencia a éste y a otros antibióticos. La resistencia del neumococo a la penicilina procede de las mutaciones en sus proteínas de unión a la penicilina. En la neumonía no complicada provocada por una cepa sensible, el tratamiento con penicilina habitualmente tiene éxito salvo que se comience demasiado tarde. También se puede usar eritromicina y clindamicina para tratar la neumonía en pacientes hipersensibles a la penicilina, pero existen cepas resistentes a estos fármacos. Los antibióticos de amplio espectro (por ejemplo, las tetraciclinas) también pueden ser eficaces, aunque las cepas resistentes a tetraciclina no son raras. A pesar de la disponibilidad de antibióticos, la mortalidad de bacteremia neumococal en las últimas cuatro décadas se ha mantenido estable entre el 25 y el 29%. (Gillespie, S.H., y col., *J. Med. Microbiol. 28*: 237-248 (1989)).

El *S. pneumoniae* se encuentra en la parte superior del tracto respiratorio de muchos individuos saludables. Se ha sugerido que la unión de los neumococos está mediada por un receptor de disacárido sobre fibronectina, presente en las células epiteliales faríngeas humanas. (Anderson, B.J., y col., *J. Immunol. 142*: 2464-2468 (1989). Los mecanismos mediante los cuales los neumococos se trasladan desde la nasofaringe hasta los pulmones, provocando con ello la neumonía, o migran a la sangre, dando lugar a bacteremia o a septicemia, son poco conocidos. (Johnston, R.B., y col., *Rev. Infect. Dis. 13* (Supl. 6): S509-517 (1991).

Se ha sugerido que varias proteínas están involucradas en la patogenicidad del *S. pneumoniae*, sin embargo sólo se ha confirmado que unas pocas de ellas son factores de virulencia. Los neumococos producen una proteasa IgA1 que podría interferir con la defensa del hospedante en las superficies mucosas. (Kornfield, S.J., y col., *Rev. Inf. Dis. 3:* 521-534 (1981)). El *S. pneumoniae* también produce neuraminidasa, una enzima que puede facilitar la unión a células epiteliales mediante la ruptura de ácido siálico procedente de los glicolípidos y gangliósidos del hospedante. Se observó que la neuraminidasa parcialmente purificada induce síntomas similares a la meningitis en ratones; sin embargo la fiabilidad de este descubrimiento ha sido cuestionada debido a que las preparaciones de neuraminidasa usadas probablemente estuvieran contaminadas con productos de la pared celular. Aparte de la neuraminidasa, existen otras proteínas neumococales implicadas en la adhesión de los neumococos a células epiteliales y endoteliales. Estas proteínas neumococales todavía no han sido identificadas. Recientemente, Cundell y col. publicaron que las permeasas de péptido pueden modular la adherencia neumococal a células epiteliales y endoteliales. Sin embargo, no queda claro si dichas permeasas actúan directamente como adhesiones o si potencian la adherencia modulando la expresión de adhesiones neumococales. (DeVelasco, E.A., y col., *Micro. Rev.* 59: 591-603 (1995)). Es necesario desarrollar un mejor entendimiento de los factores de virulencia que determinan su patogenicidad para afrontar los efectos devastadores de la enfermedad neumococal en humanos.

Irónicamente, a pesar del importante papel del *S. pneumoniae* en el descubrimiento del ADN, poco se sabe sobre la genética molecular del organismo. El genoma del *S. pneumoniae* consiste en un ADN de cadena doble, circular, cerrado covalentemente, y una colección de los denominados elementos accesorios variables, tales como profagos, plásmidos, transposones y otros similares. La mayoría de las características físicas y casi todos los genes del *S. pneumoniae* siguen siendo desconocidos. Entre los pocos que han sido identificados, la mayoría no han sido mapeados físicamente o no han sido caracterizados en detalle. Únicamente se han secuenciado unos pocos genes de este organismo. (Véase, por ejemplo, las versiones actuales del GENBANK y de otras bases de datos de ácidos nucleicos, y las referencias que se refieren al genoma del *S. pneumoniae*, tales como las presentadas a lo largo de la presente memoria). La identificación de antígenos expresados *in vivo*, y ampliamente protectores, del *S. pneumoniae* sigue siendo elusiva.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden polinucleótidos que codifican los polipéptidos de *S. pneumoniae* descritos en la Tabla 1, y que presentan las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 66. Por tanto, un aspecto de la invención proporciona moléculas ácido nucleico aisladas que comprenden polinucleótidos que presentan una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de nucleótidos que codifica las secuencias de aminoácidos del polipéptido mostrado en la Tabla 1; y (b) una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos presentada en (a).

En la presente memoria además se describen las moléculas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos que es idéntica al menos en un 90%, y más preferiblemente en al menos un 95%, un 96%, un 97%, un 98% o un 99%, a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de los anteriores apartados (a) ó (b), o un polinucleótido que se hibrida en condiciones severas de hibridación con un polinucleótido de los anteriores apartados (a) ó (b). Dicho polinucleótido que se hibrida, no se hibrida en condiciones severas de hibridación con un polinucleótido que presenta la secuencia de nucleótidos que consiste únicamente en residuos de A o únicamente en residuos de T. Otras realizaciones adicionales de ácido nucleico de la invención se refieren a moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácido de las porciones portadoras de epítopos de un polipéptido de *S. pneumoniae* que presenta una secuencia de aminoácido del apartado (a) anterior.

La presente invención también se refiere a vectores recombinantes, que incluyen las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención, y a células hospedantes que contienen los vectores recombinantes, así como a métodos de obtención de dichos vectores y células hospedantes, y para el uso de dichos vectores en la producción de polipéptidos o péptidos de *S. pneumoniae* mediante técnicas recombinantes.

La invención además proporciona polipéptidos de *S. pneumoniae* aislados que presentan una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos del polipéptido descrito en la Tabla 1.

Los polipéptidos de la presente descripción también incluyen polipéptidos que presentan una secuencia de aminoácidos con al menos una similitud de al menos el 70%, y más preferiblemente de al menos el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% ó el 99%, con respecto a los descritos en la Tabla 1, así como polipéptidos que presentan una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 70%, más preferiblemente idéntica en al menos el 75%, y aún más preferiblemente idéntica en al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% ó el 99%, a los anteriores; así como moléculas de ácido nucleico que codifican dichos polipéptidos.

La presente invención proporciona además una vacuna, preferiblemente una vacuna multicomponente, que comprende el polinucleótido o polipéptido de *S. pneumoniae* descrito en la Tabla 1, o fragmentos del mismo, junto con un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que se encuentra(n) presente(s) el(los) polipéptido(s) de *S. pneumoniae* en una cantidad eficaz para provocar una respuesta inmune a miembros del género *Streptococcus* en un animal. Los polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención pueden combinarse adicionalmente con uno o más inmunógenos de uno o más organismos adicionales estreptococales o no estreptococales para producir una vacuna multicomponente que busque provocar una respuesta inmunológica frente a miembros del género *Streptococcus* y, opcionalmente, frente a uno o más organismos no estreptococales.

Las vacunas de la presente invención se pueden administrar en una forma de ADN, por ejemplo, ADN "desnudo", en el que el ADN codifica uno o más polipéptidos estreptococales y, opcionalmente, uno o más polipéptidos de un organismo no estreptococal. El ADN que codifica uno o más polipéptidos se puede construir de tal forma que dichos polipéptidos sean proteínas de fusión expresadas.

Las vacunas de la presente invención también se pueden administrar como un componente de un organismo diseñado genéticamente. De este modo, un organismo diseñado genéticamente que expresa uno o más polipéptidos de *S. pneumoniae* puede administrarse a un animal. Por ejemplo, dicho organismo diseñado genéticamente puede contener uno o más polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención intracelularmente, en su superficie celular o en su espacio periplásmico. Además, dicho organismo diseñado genéticamente puede segregar uno o más polipéptidos de *S. pneumoniae*.

Las vacunas de la presente invención pueden co-administrarse a un animal con un modulador del sistema inmune (por ejemplo, CD86 y GM-CSF).

La invención también se refiere al uso de los polinucleótidos o polipéptidos descritos en la Tabla 1, o de fragmentos de los mismos, para la preparación de una vacuna que induzca una respuesta inmunológica en un animal frente a uno o más miembros del género *Streptococcus*, preferiblemente frente a uno o más elementos aislados del género *S. pneumoniae*.

La invención se refiere al uso de los polinucleótidos o polipéptidos descritos en la Tabla 1, o de fragmentos de los mismos, para la preparación de una vacuna que induzca una respuesta inmune protectora en un animal, suficiente para prevenir o atenuar una infección causada por los miembros del género *Streptococcus*, preferiblemente al menos por *S. pneumoniae*. Además, dichos polipéptidos, o fragmentos de los mismos, se pueden conjugar con otro inmunógeno y/o administrar mezclados con un adyuvante.

La invención se refiere además a anticuerpos activados en un animal mediante la administración de uno o más polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención. En la presente memoria también se describen métodos para la producción de dichos anticuerpos.

La invención también proporciona métodos diagnósticos para la detección de la expresión de genes de miembros del género *Streptococcus* en un animal. Uno de dichos métodos incluye el ensayo para determinar la expresión de un gen que codifica péptidos de *S. pneumoniae* en una muestra procedente de un animal. Dicha expresión se puede determinar directamente (por ejemplo, determinando los niveles de polipéptido usando anticuerpos activados como respuesta a las secuencias de aminoácidos descritas en la Tabla 1) o indirectamente (por ejemplo, determinando los anticuerpos que presentan especificidad por las secuencias de aminoácidos descritas en la Tabla 1). Un ejemplo de dicho método incluye el uso de reacción de cadena de polimerasa (PCR) para amplificar y detectar secuencias de ácido nucleico de *Streptococcus*.

En la presente memoria se describen sondas de ácido nucleico que presentan una secuencia de nucleótidos completa, o parte, descrita en la Tabla 1 (mostrada como SEQ ID NO: 65), que son capaces de hibridarse en condiciones severas con ácidos nucleicos de *Streptococcus*. La invención se refiere además a un método para detectar uno o más ácidos nucleicos de *Streptococcus* en una muestra biológica obtenida de un animal, codificando dichos uno o más ácidos nucleicos polipéptidos de *Streptococcus*, que comprende: (a) poner en contacto la muestra con una o más de las anteriores sondas de ácido nucleico, en condiciones tales que se produzca la hibridación, y (b) detectar la hibridación de dichas una o más sondas con el ácido nucleico de *Streptococcus* presente en la muestra biológica.

La invención también incluye inmunoensayos, incluyendo un inmunoensayo para la detección de *Streptococcus*, preferiblemente al menos de elementos aislados del género de *S. pneumoniae*, que comprende la incubación de una muestra (que se sospecha está infectada con *Streptococcus*) con un anticuerpo sonda dirigido contra un antígeno/epítopo de *S. pneumoniae*, para ser detectado en las condiciones que permitan la formación de un complejo antígeno-anticuerpo; y la detección del complejo antígeno-anticuerpo que contiene el anticuerpo sonda. Un inmunoensayo para la detección de anticuerpos que están dirigidos contra un antígeno de *Streptococcus* que comprende la incubación de una muestra (que contiene anticuerpos procedentes de un mamífero que se sospecha está infectado con *Streptococcus*) con un polipéptido sonda que incluye un epítopo de *S. pneumoniae*, en las condiciones que permiten la formación de complejos antígeno-anticuerpo que contienen el epítopo sonda que contiene el antígeno.

Algunos aspectos de la invención que están relacionados con kits son los correspondientes a: la investigación de muestras en busca de la presencia de polinucleótidos derivados de *Streptococcus* que comprenden una sonda de polinucleótido que incluye una secuencia de nucleótidos seleccionada de la Tabla 1, o un fragmento de la misma de aproximadamente 15 o más nucleótidos, en un recipiente adecuado; analizar las muestras en busca de la presencia de anticuerpos dirigidos contra un antígeno de *Streptococcus* constituido por un polipéptido que contiene un epítopo de *S. pneumoniae* presente en el polipéptido, en un contenedor adecuado; y analizar muestras en busca de la presencia de antígenos de *Streptococcus* constituidos por un anticuerpo anti-*S. pneumoniae*, en un contenedor adecuado.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a polipéptidos de *S. pneumoniae* antigénicos recombinantes y a fragmentos de los mismos. La invención también se refiere a métodos para el uso de dichos polipéptidos para producir respuestas inmunológicas y para conferir protección inmunológica frente a enfermedades causadas por los miembros del género de los *Streptococcus*, al menos por elementos aislados del género de *S. pneumoniae*. La invención se refiere además a secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de *S. pneumoniae* antigénicos y a los métodos para la detección de ácidos nucleicos y polipéptidos de *S. pneumoniae* en muestras biológicas. La invención también se refiere a anticuerpos específicos de *S. pneumoniae* y a métodos para la detección de dichos anticuerpos producidos en un animal hospedante.

En concreto, la presente invención se refiere a las siguientes realizaciones: la presente invención se refiere a un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en (a) polinucleótidos que codifican el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos deducida presentada en la SEQ ID NO: 66; (b) polinucleótidos que tienen la secuencia codificadora presentada en la SEQ ID NO: 65 que codifica el polipéptido; (c) polinucleótidos que son idénticos en al menos un 95% a la secuencia codificadora mostrada en la SEQ ID NO: 65, o a la secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 66; (d) polinucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia

de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 66, o a la secuencia codificadora mostrada en la SEQ ID NO: 65; (e) polinucleótidos que codifican una porción portadora de epítopo de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: de Gly-11 a Arg-19; de Ile-23 a Lys-31; de His-145 a Asn-151; de Gln-159 a Asp-166; de Ile-175 a Asp-181; de Gly-213 a Tyr-225; de Ile-283 a Val-291; de Pro-329 a Glu-364; de Arg-372 a Ser-386; de Thr-421 a Phe-430; de Leu-445 a Val-453; de Ile-486 a Ala-497; de Asp-524 a Ala-535; de His-662 a Gly-674; y de His-689 a Gln-702; y (f) polinucleótidos que codifican fragmentos que comprenden al menos 50 aminoácidos contiguos de un polipéptido codificado por un polinucleótido de un apartado cualquiera de (a) a (d), ó la cadena complementaria de dicho polinucleótido.

El polinucleótido de la presente invención es ADN ó ARN.

La presente invención se refiere además a un método de fabricación de un vector recombinante que comprende insertar un polinucleótido de la presente invención en un vector.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un vector recombinante que contiene el polinucleótido de la presente invención o el producido por el método descrito anteriormente, en el que el vector descrito anteriormente, en el cual el polinucleótido está ligado operativamente a una secuencia de control de expresión, permite la expresión en células hospedantes procarióticas o eucarióticas.

La presente invención además se refiere a un método para la fabricación de una célula hospedante recombinante introduciendo el vector descrito antes en una célula hospedante.

En una realización adicional la presente invención proporciona una célula hospedante transformada con el vector descrito anteriormente o producida con el método anterior.

En otra realización, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de un polipéptido codificado por el polinucleótido de la presente invención que comprende: cultivar la célula hospedante descrita anteriormente y recuperar el polipéptido codificado por dicho polinucleótido procedente del cultivo.

Además, la presente invención proporciona un polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de la presente invención o que puede obtenerse mediante el proceso de producción de un polipéptido descrito anteriormente; y un antígeno de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una porción portadora de epítopo seleccionada del grupo que consiste en: de Gly-11 a Arg-19; de Ile-23 a Lys-31; de His-145 a Asn-151; de Gln-159 a Asp-166; de Ile-175 a Asp-181; de Gly-213 a Tyr-225; de Ile-283 a Val-291; de Pro-329 a Glu-364; de Arg-372 a Ser-386; de Thr-421 a Phe-430; de Leu-445 a Val-453; de Ile-486 a Ala-497; de Asp-524 a Ala-535; de His-662 a Gly-674; y de His-689 a Gln-702.

La presente invención también proporciona una proteína codificada por un polinucleótido de la presente invención que carece de metionina N-terminal; y una proteína de fusión que comprende el polipéptido de la reivindicación 10 y una secuencia de polipéptidos heteróloga.

La presente invención proporciona además un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la presente invención; y un hibridoma que produce el anticuerpo de la reivindicación 14.

La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido del polipéptido de un ADN codificador y capaz de expresar dicho polipéptido *in vivo*, o del anticuerpo de la presente invención, y opcionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, así como una composición diagnóstica que comprende el polinucleótido o el anticuerpo de la presente invención.

La presente invención también se refiere al uso del polinucleótido del polipéptido o del anticuerpo de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención o la atenuación de una infección provocada por un miembro del género *Streptococcus*.

La presente invención también se refiere a un proceso diagnóstico que comprende analizar la presencia del polipéptido de la presente invención en una muestra derivada de un hospedante.

En una realización preferida de la presente invención, la composición farmacéutica de la presente invención es una vacuna que preferiblemente comprende (a) un polipéptido de *S. pneumoniae* de la presente invención o un fragmento del mismo; y (b) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; en el que dicho polipéptido está presente en una cantidad eficaz para activar anticuerpos protectores en un animal frente a un miembro del género *Streptococcus*.

Además, la presente invención se refiere a un método para la detección de ácidos nucleicos de *Streptococcus* en una muestra biológica obtenida a partir de un animal, que comprende (a) poner en contacto la muestra con una o más sondas de ácido nucleico que comprenden el polinucleótido de la presente invención en condiciones en las que se produce la hibridación; y (b) detectar la hibridación de dichas una o más sondas con una o más secuencias de ácido nucleico de Streptococcus presentes en la muestra biológica.

La presente invención también se refiere a un método para la detección de ácidos nucleicos de *Streptococcus* en una muestra biológica obtenida de un animal, que comprende (a) amplificar una o más secuencias de ácido nucleico de *Streptococcus* en dicha muestra usando el polinucleótido de la presente invención y reacción en cadena de polimerasa; y (b) detectar dicho ácido nucleico amplificado de *Streptococcus*.

La presente invención también se refiere a un kit para la detección de anticuerpos de *Streptococcus* en una muestra biológica obtenida de un animal, que comprende (a) un medio de detección.

La presente invención se refiere además a un método de detección de anticuerpos de *Streptococcus* en una muestra biológica obtenida de un animal, que comprende (a) poner en contacto la muestra con un polipéptido de la presente invención, y (b) detectar complejos anticuerpo-antígeno.

Definiciones

Las siguientes definiciones se proporcionan para aclarar la materia que los inventores consideran constituyente de la presente invención.

Tal como se usa en la presente memoria, la frase "agente patogénico" significa un agente que provoca un estado de enfermedad o afección en un animal. Dentro de esta definición se incluyen, por ejemplo, bacterias, protozoos, hongos, virus y parásitos metazoos, que producen un estado de enfermedad o hacen que un animal infectado con dichos organismos sea susceptible a un estado de enfermedad (por ejemplo, una infección secundaria). Además se incluyen especies y cepas del género *Streptococcus* que producen estados de enfermedad en animales.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "organismo" significa cualquier sistema biológico vivo, incluyendo virus, independientemente de si es un agente patógeno o no.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "*Streptococcus*" significa cualquier especie o cepa de bacterias que es un miembro del género *Streptococcus*. Dichas especies y cepas son conocidas por los especialistas en la técnica, e incluyen los que son patogénicos y los que no.

Tal como se usa en la presente memoria, la frase "polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención" significa polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de *S. pneumoniae* descrita en la Tabla 1 y presentada como SEQ ID NO: 66. Dichos polipéptidos se pueden expresar como proteína de fusión en las que los polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención están ligados a secuencias adicionales de aminoácidos que pueden ser de origen estreptococal o no estreptococal. Esta expresión también incluye fragmentos de polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención.

A lo largo de la especificación se proporcionan definiciones adicionales.

Explicación de la Tabla 1

La Tabla 1, presentada más adelante, proporciona información que describe 113 marcos de lectura abiertos (ORFs) que potencialmente codifican polipéptidos antigénicos de *S. pneumoniae* de la presente invención. La Tabla muestra el identificador de ORF, que consiste en las letras SP, que denotan *S. pneumoniae*, seguidas inmediatamente por un código numérico de tres dígitos, que numera de forma arbitraria los polipéptidos potencialmente antigénicos de *S. pneumoniae* de la presente invención y la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos de cada ORF y polipéptido codificado. La secuencia de nucleótidos o de aminoácidos real para cada identificador de ORF también se muestra en el Listado de Secuencias con el correspondiente SEQ ID NO.

De este modo, por ejemplo, la designación "SP126" se refiere tanto a secuencias de nucleótidos como a secuencias de aminoácidos del polipéptido de *S. pneumoniae* número 126 de la presente invención. Además, el "SP126" se corresponde con la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 65 y con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 66 tal como se presenta en la Tabla 1.

El marco de lectura abierto del "ORF" comienza con el segundo nucleótido mostrado. Por tanto, el primer codón correspondiente a cada secuencia de nucleótidos mostrada son las bases 2-4, el segundo las 5-7, el tercero las 8-10, y así sucesivamente.

Explicación de la Tabla 2

La Tabla 2 enumera los epítopos antigénicos presentes en el polipéptido de *S. pneumoniae* descrito en la Tabla 1 según la predicción de los inventores. El polipéptido de *S. pneumoniae* mostrado en la Tabla 1 presenta uno o más epítopos antigénicos descritos en la Tabla 2. Cabe destacar que dependiendo de los criterios analíticos usados para predecir determinantes antigénicos, la dirección exacta del determinante puede variar ligeramente. La localización exacta del determinante antigénico puede desplazarse en aproximadamente de 1 a 5 residuos, con mayor probabilidad de 1 a 2 residuos, dependiendo de los criterios usados. También cabe destacar, hablando de forma general, que se pueden añadir aminoácidos en el extremo de un péptido o polipéptido que contiene un epítopo antigénico sin afectar a su actividad, mientras que es mucho más probable que la eliminación de residuos de un péptido o polipéptido que

contenga únicamente un determinante antigénico destruya su actividad. Cabe destacar que los residuos y localizaciones presentados y descritos en la Tabla 2 se corresponden con las secuencias de aminoácidos correspondientes al ORF mostrado en la Tabla 1 y en el Listado de Secuencias.

Explicación de la Tabla 3

La Tabla 3 muestra prímeros PCR designados por los inventores para la amplificación de polinucleótidos que codifican polipéptidos de la presente invención de acuerdo con el método del Ejemplo 1. El diseño de prímeros PCR es rutinario en la técnica, y los mostrados en la Tabla 3 se proporcionan meramente para mayor comodidad del especialista. Cabe destacar que se pueden usar otros prímeros con el mismo resultado. Para cada prímero, la tabla enumera la correspondiente designación ORF a partir de la Tabla 1 seguida de una "A" o de una "B". Los prímeros "A" son los prímeros 5' y los prímeros "B" son los 3'. Se construyó una posición de enzima de restricción en cada prímero para facilitar la clonación. La enzima de restricción que reconocerá y actuará sobre una secuencia dentro de cada prímero se muestra asimismo en la Tabla 3, bajo la nomenclatura "RE" de enzima de restricción en inglés ("restriction enzyme"). Finalmente, en la Tabla 3 se muestra el identificador de secuencia para cada prímero para facilitar la correlación con el Listado de Secuencias.

Selección de secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos antigénicos de S. pneumoniae

La presente invención proporciona un número selecto de ORFs de entre los presentados en los fragmentos del genoma de *S. pneumoniae* que pueden resultar útiles para la generación de una respuesta inmune protectora. El ADN genómico de *S. pneumoniae* secuenciado se obtuvo a partir de elementos aislados sub-cultivados de la Cepa de *S. pneumoniae* 7/87 14.8.91, que ha sido depositada en la American Type Culture Collection, para comodidad de los especialistas en la técnica. El elemento aislado de *S. pneumoniae* se depositó el 10 de Octubre de 1996 en la ATCC, 12301 Park Lawn Drive, Rockville, Maryland 20852, y se le dio el número de acceso 55840. También se depositó una biblioteca genómica construida a partir de ADN aislado a partir de elementos aislados de *S. pneumoniae* en la ATCC el 11 de Octubre de 1996, y se le asignó el Nº de Depósito ATCC 97755. Un listado más completo de la secuencia obtenida a partir de genoma de *S. pneumoniae* puede encontrarse en la Solicitud Provisional de EE.UU. con Nº de Serie 60/029.960, presentada el 31-10-96, incorporada al completo a la presente memoria a modo de referencia. Algunos ORFs contenidos en el subconjunto de fragmentos del genoma de *S. pneumoniae* descrito en la presente memoria fueron derivados a través del uso de una serie de criterios de monitorización detallados más adelante.

Los ORFs seleccionados no consistieron en ORFs completos, Aunque un polipéptido que representa un ORF completo puede constituir la mejor aproximación a una proteína nativa de un organismo, no siempre se prefiere expresar un ORF completo en un sistema heterólogo. Un reto sería expresar y purificar una proteína altamente hidrofóbica mediante métodos comunes de laboratorio. Así, los candidatos de vacuna de polipéptidos descritos en la presente memoria pueden haber sido modificados ligeramente para simplificar la producción de la proteína recombinante. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos que codifican dominios altamente hidrofóbicos, tales como los encontrados en la secuencia de señal aminoterminal, han sido excluidas de algunas construcciones usadas para la expresión *in vitro* de los polipéptidos. Además, cualquier secuencia de aminoácidos altamente hidrofóbica que se encuentre en el extremo carboxi también ha sido excluida de las construcciones de expresión recombinante. Por tanto, en una realización, se puede usar como antígeno un polipéptido que representa un ORF truncado o modificado.

Aunque en la técnica se conocen numerosos métodos para la selección de polipéptidos potencialmente inmunogénicos, muchos de los ORFs descritos en la presente memoria fueron seleccionados en base a un escrutinio de todos los ORFs teóricos de *S. pneumoniae* en función de varios aspectos de inmunogenicidad potencial. A continuación se presenta un conjunto de criterios de selección:

1. *Secuencia de señal de Tipo I*: Una secuencia de señal aminoterminal de tipo I normalmente dirige una proteína naciente a través del plasma y fuera de las membranas hasta el exterior de la célula bacteriana. La evidencia experimental obtenida a partir de estudios con la *Escherichia coli* sugiere que la secuencia de señal de tipo I típica consiste en los siguientes atributos bioquímicos y físicos (Izard, J.W. y Kendall, D.A., *Mol. Microbiol.* 13: 765-773 (1994)). La longitud de la secuencia de señal de tipo I es de aproximadamente 15 a 25 residuos de aminoácidos principalmente hidrofóbicos con una carga neta positiva en el extremo amino. Adicionalmente, la región central de la secuencia de señal adopta un conformación alfa-helicoidal en un entorno hidrofóbico. Finalmente, la región que rodea la posición real de ruptura idealmente tiene una longitud de seis residuos, con pequeñas cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones -1 y -3.

2. *Secuencia señal de Tipo IV*: La secuencia señal de tipo IV es un ejemplo de varios tipos de secuencias de señal funcionales que existen además de la secuencia de señal de tipo I detallada antes. Aunque funcionalmente están relacionadas, la secuencia de señal de tipo IV posee una combinación única de atributos bioquímicos y físicos (Strom, M. S. y Lory, S., *J. Bacteriol.* 174: 7345-7351 (1992)). Normalmente son de seis a ocho aminoácidos con una carga neta básica seguidos de otros dieciséis a treinta residuos principalmente hidrofóbicos adicionales. La posición de ruptura de una secuencia de señal de tipo IV se encuentra normalmente después de los primeros seis a ocho aminoácidos en el extremo amino. Adicionalmente, las secuencias de señal de tipo IV generalmente contienen un residuo de fenilalanina en la posición +1 relativa a la posición de ruptura.

3. *Lipoproteína*: Los estudios de las posiciones de ruptura de veintiséis precursores de lipoproteína bacteriana han permitido definir una secuencia de aminoácidos de consenso para la ruptura de lipoproteína. Aproximadamente tres cuartos de los precursores de lipoproteína bacteriana pre-examinados contenían la secuencia L-(A,S)-(G,A)-C en las posiciones -3 a +1, relativas al punto de ruptura (Hayashi, S. y Wu, H.C., *J. Bioenerg. Biomembr.* 22: 451-471 (1990)).

4. *Estructura LPXTG*: Se ha determinado experimentalmente que la mayoría de las proteínas ancladas encontradas sobre la superficie de bacterias gram positivas posee una secuencia carboxiterminal altamente conservada. Más de cincuenta de dichas proteínas procedentes de organismos tales como *S. pyogenes*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. pneumoniae*, y otros, han sido identificadas en base a su localización extracelular y a su secuencia de aminoácidos carboxiterminal (Fischetti, V. A., *ASM News* 62: 405-410 (1996)). La región conservada consiste en seis aminoácidos cargados en el término carboxi acoplados a 15-20 aminoácidos hidrofóbicos que se supone funcionan como un dominio transmembrana. Inmediatamente adyacentes al dominio transmembrana se encuentra una secuencia de seis aminoácidos conservados en casi todas las proteínas examinadas. La secuencia de aminoácidos de esta región es L-P-X-T-G-X, en la que X es cualquier aminoácido.

Se desarrolló un algoritmo para seleccionar polipéptidos de *S. pneumoniae* antigénicos e inmunogénicos que incluye los anteriores criterios. El uso del algoritmo por los inventores para seleccionar polipéptidos de *S. pneumoniae* inmunológicamente útiles dio como resultado la selección de una serie de los ORFs descritos. Los polipéptidos que comprenden los polipéptidos identificados en este grupo pueden producirse mediante técnicas estándar en la técnica, descritas en la presente memoria.

Moléculas de ácido nucleico

La presente invención proporciona moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos que codifican los polipéptidos de *S. pneumoniae* que presentan las secuencias de aminoácido descritas en la Tabla 1 y que se muestran como SEQ ID NO: 66, que se determinan mediante el secuenciamiento del genoma de *S. pneumoniae* y se seleccionan como inmunógenos putativos.

A no ser que indicó lo contrario, todas las secuencias de nucleótidos determinadas mediante el secuenciamiento de una molécula de ADN en la presente memoria fueron determinadas usando un secuenciador de ADN automático (tal como el Modelo 373 de Applied Biosystems, Inc.), y todas las secuencias de aminoácidos de polipéptidos codificados por las moléculas de ADN determinadas en la presente memoria fueron predichas mediante traducción de las secuencias de ADN determinadas como se ha indicado antes. Por lo tanto, tal como se conoce en la técnica para cualquier secuencia de ADN determinada mediante esta estrategia automatizada, cualquier secuencia de nucleótidos determinada en la presente memoria puede contener algunos errores. Las secuencias de nucleótidos determinadas automáticamente normalmente son idénticas en al menos un 90%, más habitualmente en al menos aproximadamente entre un 95% y aproximadamente un 99,9%, a la secuencia de nucleótidos real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real puede determinarse con mayor precisión empleando otras estrategias, incluyendo los métodos de secuenciamiento de ADN manual, bien conocidos en la técnica. Asimismo, como es sabido en la técnica, una única inserción o eliminación en una secuencia de nucleótidos determinada en comparación con la secuencia real provocará un desplazamiento de marco en la traducción de la secuencia de nucleótidos, de tal modo que la secuencia de aminoácidos predicha codificada por una secuencia de nucleótidos determinada será completamente diferente a la secuencia de aminoácidos codificada realmente por la molécula de ADN secuenciada, comenzando en el punto en el que se haya realizado dicha inserción o eliminación.

A no ser que se indique lo contrario, cada "secuencia de nucleótidos" establecida en la presente memoria se presenta como una secuencia de desoxirribonucleótidos (en forma abreviada: A, G, C y T). Sin embargo, por "secuencia de nucleótidos" de una molécula de ácido nucleico o polinucleótido se entiende, para una molécula o polinucleótido de ADN, una secuencia de desoxirribonucleótidos, y para una molécula o polinucleótido de ARN, la correspondiente secuencia de ribonucleótidos (A, G, C y U), en la que cada desoxirribonucleótido de timidina (T) en una secuencia de desoxirribonucleótidos especificada es sustituido por un ribonucleótido de uridina (U). Por ejemplo, en referencia a una molécula de ARN que presenta una secuencia descrita en la Tabla 1 establecida usando abreviaturas de desoxirribonucleótidos, se pretende indicar una molécula de ARN que presenta una secuencia en la que cada desoxirribonucleótido A, G ó C descrito en la Tabla 1 ha sido sustituido por el correspondiente ribonucleótido A, G ó C, y cada desoxirribonucleótido T ha sido sustituido por un ribonucleótido U.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden encontrarse en la forma de ARN, tal como mARN, o en la forma de ADN, incluyendo, por ejemplo, cADN y ADN genómico obtenido por clonación o producido sintéticamente. El ADN puede ser de doble cadena o de cadena sencilla. El ADN ó ARN de cadena sencilla puede ser la cadena codificadora, también conocida como cadena sentido, o puede ser la cadena no codificadora, también denominada cadena antisentido.

Por molécula(s) de ácido nucleico "aislada(s)" se entiendo una molécula de ácido nucleico, ADN ó ARN, que ha sido separada de su entorno nativo. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas para los propósitos de la presente invención. Otros ejemplos de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinante mantenidas en células hospedantes heterólogas o moléculas de ADN purificadas (parcial o sustancialmente) en disolución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen tránscritos *in vivo* o *in vitro* de

las moléculas de ADN de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la presente invención incluyen además dichas moléculas producidas sintéticamente.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención incluyen moléculas de ADN que comprenden una secuencia de nucleótidos descrita en la Tabla 1 y mostrada como SEQ ID NO: 65; las moléculas de ADN que comprenden las secuencias codificadoras correspondientes a los polipéptidos descritos en la Tabla 1 y mostradas como SEQ ID NO: 66; y moléculas de ADN que comprenden secuencias sustancialmente diferentes a las descritas anteriormente pero que, debido a la degeneración del código genético, todavía codifican los polipéptidos de S. pneumoniae descritos en la Tabla 1. Por supuesto, el código genético es bien conocido en la técnica. Por tanto, sería rutinario para el especialista en la técnica generar dichas variantes degeneradas.

La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias complementarias a cualquiera de las descritas en la Tabla 1. Dichas moléculas aisladas, particularmente moléculas de ADN, son útiles como sondas para la detección de la expresión de genes de Streptococcus, por ejemplo, empleando análisis Northern blot o la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

La presente invención está dirigida además a fragmentos de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en la presente memoria. Por un fragmento de una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia de nucleótidos descrita en la Tabla 1, se entienden fragmentos de al menos aproximadamente 15 nt, y más preferiblemente de al menos aproximadamente 17 nt, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente 20 nt, e incluso más preferiblemente, de al menos aproximadamente 25 nt de longitud, que son útiles como sondas diagnósticas y como primeros, tal como se discute en la presente memoria. Por supuesto, los fragmentos más grandes, de 50-100 nt de longitud, también son útiles de acuerdo con la presente invención, ya que son fragmentos correspondientes a la mayoría, si no al total, de una secuencia de nucleótidos descrita en la Tabla 1. Por un fragmento de al menos 20 nt de longitud, por ejemplo, se entiende un fragmento que incluye 20 o más bases contiguas de una secuencia de nucleótidos como la descrita en la Tabla 1. Puesto que la secuencia de nucleótidos identificada en la Tabla 1 se proporciona como SEQ ID NO: 65, generar dichos fragmentos de ADN sería una tarea rutinaria para un especialista en la técnica. Por ejemplo, dichos fragmentos podrían ser generados de forma sintética.

Los fragmentos de ácido nucleico preferidos también incluyen moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican porciones que portan epítopos del polipéptido de *S. pneumoniae* identificado en la Tabla 1. Dichos fragmentos de ácido nucleico de la presente invención incluyen, por ejemplo, secuencias de nucleótidos que codifican fragmentos de polipéptido que comprenden desde aproximadamente el resido aminoterminal hasta aproximadamente el residuo carboxiterminal de cada fragmento mostrado en la Tabla 2. Los anteriormente referidos fragmentos de polipéptido son regiones antigénicas de los polipéptidos de *S. pneumoniae* identificados en la Tabla 1.

En la presente memoria también se describen moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden polinucleótidos que se hibridan en condiciones de hibridación severas con una porción de un polinucleótido de una molécula de ácido nucleico de la invención descrita anteriormente, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico identificada en la Tabla 1. Por "condiciones de hibridación severas" se entiende una incubación durante toda la noche a 42°C en una disolución que comprende: 50% de formamida, 5x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x disolución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 g/mL de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de un lavado de los filtros con 0,1x SSC a aproximadamente 65ºC.

Por polinucleótidos que se hibridan a una "porción" de un polinucleótido se entiende polinucleótidos (ADN ó ARN) que se hibrida con al menos aproximadamente 15 nucleótidos (nt), y más preferiblemente con al menos aproximadamente 17 nt, aún más preferiblemente con al menos aproximadamente 20 nt, e incluso más preferiblemente con aproximadamente 25-70 nt del polinucleótido de referencia. Éstos son útiles como sondas diagnósticas y como primeros, tal como se ha discutido anteriormente y como se discute más detalladamente a continuación.

Por supuesto, los polinucleótidos que se hibridan con una porción mayor del polinucleótido de referencia, por ejemplo, con una porción de 50-100 nt de longitud, o incluso con la longitud completa del polinucleótido de referencia, también son útiles como sondas de acuerdo con la presente invención, como lo son los polinucleótidos correspondientes a la mayoría, si no al total, de una secuencia de nucleótidos como la identificada en la Tabla 1. Por una porción de un polinucleótido de "al menos 20 nt de longitud", por ejemplo, se entiende 20 o más nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de referencia (por ejemplo, las secuencias de nucleótidos descritas en la Tabla 1). Como se ha indicado anteriormente, dichas porciones son útiles para el diagnóstico, como sondas de acuerdo con técnicas de hibridación de ADN convencionales, y como primeros para la amplificación de una secuencia objetivo mediante PCR, tal como se describe en la bibliografía (por ejemplo, en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual,* 2ª edición, Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), cuya descripción completa se incorpora a la presente memoria a modo de referencia).

Puesto que la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de *S. pneumoniae* de la presente invención está identificada en la Tabla 1 y se proporciona como SEQ ID NO: 65, la generación de polinucleótidos que se hibriden con porciones de dichas secuencias será una tarea rutinaria para el especialista en la técnica. Por ejemplo, los polinucleótidos de hibridación de la presente invención podrían ser generados sintéticamente empleando técnicas conocidas.

Como se ha indicado, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que codifican polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención pueden incluir, aunque sin que suponga una limitación, aquellas que codifican secuencias de aminoácidos de los polipéptidos por sí mismos; y secuencias codificadoras adicionales que codifican aminoácidos adicionales, tales como los que proporcionan funcionalidades adicionales. De este modo, las secuencias que codifican dichos polipéptidos pueden fusionarse con una secuencia marcadora, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En determinadas realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (Qiagen, Inc.), entre otros, muchos de los cuales se encuentran disponibles comercialmente. Por ejemplo, según lo descrito por Gentz y colegas (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 821-824 (1989)), la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión resultante.

Por tanto, la presente invención también incluye fusiones genéticas en las que la secuencia de ácido nucleico de *S. pneumoniae*, que codifica secuencias identificadas en la Tabla 1, está unida a secuencias adicionales de ácido nucleico para producir proteínas de fusión. Dichas proteínas de fusión pueden incluir epítopos de origen estreptococal o no estreptococal diseñados para producir proteínas que presenten una inmunogenicidad potenciada. Además, las proteínas de fusión de la presente invención pueden contener determinantes antigénicos que proporcionen la estimulación de células T colaboradoras, péptidos que codifiquen posiciones para las modificaciones post-translacionales que potencian la inmunogenicidad (por ejemplo, acilación), péptidos que faciliten la purificación (por ejemplo, "etiqueta" de histidina), o secuencias de aminoácidos que dirijan la proteína de fusión hacia una localización deseada (por ejemplo, una secuencia líder heteróloga).

En todos los casos de expresión bacteriana, se añade un residuo de metionina N-terminal. Sin embargo, en muchos casos, los residuos de metionina N-terminal son eliminados post-translacionalmente. Por tanto, la invención incluye polipéptidos presentados en la Tabla 1 con y sin una metionina N-terminal.

De este modo la invención incluye moléculas y secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión que comprenden uno o más polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención fusionados con una secuencia de aminoácidos que permite la modificación post-translacional para potenciar la inmunogenicidad. Esta modificación post-translacional puede producirse *in vitro* o cuando la proteína de fusión está expresada *in vivo* en una célula hospedante. Un ejemplo de dicha modificación es la introducción de una secuencia de aminoácidos que da como resultado la unión de un resto de lípido.

Por tanto, como se ha indicado anteriormente, la presente invención incluye fusiones genéticas en las que una secuencia de ácido nucleico de *S. pneumoniae* identificada en la Tabla 1 se une a una secuencia de nucleótidos que codifica otra secuencia de aminoácidos. Estas otras secuencias de aminoácidos pueden ser de origen estreptococal (por ejemplo, otra secuencia seleccionada de la Tabla 1) o de origen no estreptococal.

En la presente memoria también se describen variantes de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención, que codifican porciones, análogos o derivados de los polipéptidos de *S. pneumoniae* descritos en la Tabla 1. Las variantes pueden existir de forma natural, tales como una variante alélica natural. Por "variante alélica" se entiende una de varias formas alternativas de un gen que ocupa una posición dada en un cromosoma de un organismo (*Genes II*, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985)). Las variantes que no existen de forma natural se pueden producir usando técnicas de mutagénesis conocidas.

Dichas variantes incluyen las producidas mediante sustituciones, eliminaciones o adiciones de nucleótidos. Las sustituciones, eliminaciones o adiciones pueden incluir uno o más nucleótidos. Dichas variantes pueden alterarse en regiones codificadoras, en regiones no codificadoras, o en ambas. Las alteraciones en las regiones codificadoras pueden producir sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas. Entre ellas se prefieren especialmente las sustituciones, adiciones y eliminaciones silenciosas, que no alteran las propiedades y las actividades de los polipéptidos de *S. pneumoniae* descritos en la presente memoria, o de porciones de los mismos. Las sustituciones silenciosas tienen más probabilidad de producirse en regiones no epitópicas. En la presente memoria se proporciona una guía acerca de las regiones que contienen epítopos, por ejemplo, en la Tabla 2. También son especialmente preferidas en este contexto las sustituciones conservativas.

Otras realizaciones de la invención incluyen moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido que presenta una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos el 95% a: (a) la secuencia de nucleótidos que codifica las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos identificados en la Tabla 1; y (b) una secuencia de nucleótidos complementaria a las secuencias de nucleótidos del apartado (a) anterior.

Por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es "idéntica" en al menos el 95% a una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica un polipéptido de *S. pneumoniae* descrito en la Tabla 1, se entiende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia que codifica el polipéptido de *S. pneumoniae* en cuestión. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos idéntica en al menos un 95% a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta un 5% de los nucleótidos de la secuencia de referencia pueden ser eliminados o sustituidos por otro nucleótido, o un número de nucleótidos de hasta un 5% del total de nucleótidos de la secuencia de referencia pueden ser insertados en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones

terminales 5' y 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia, o en cualquier lugar entre dichas posiciones terminales, dispersadas individualmente entre los nucleótidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Determinados nucleótidos dentro de algunas de las secuencias de ácido nucleico mostradas en la Tabla 1 resultaron ambiguos al secuenciamiento. Las secuencias completamente desconocidas se muestran como una "N". Se sabe que otros nucleótidos no resueltos son una purina, mostrados como "R", o una pirimidina, mostrados como "Y". Del mismo modo, cuando se determina la identidad entre dos secuencias de nucleótidos, se acepta la identidad cuando se encuentra cualquier nucleótido, incluyendo un "R", "Y" ó "N", en una secuencia de ensayo y en la correspondiente posición de la secuencia de referencia (de la Tabla 1). Igualmente, una A, G ó "R" en una secuencia de ensayo es idéntica a una "R" de la secuencia de referencia; y una T, C ó "Y" en una secuencia de ensayo es idéntica a una "Y" en la secuencia de referencia.

A modo práctico, el hecho de que una molécula cualquiera de ácido nucleico en concreto sea idéntica en al menos un 90%, un 95%, un 96%, un 97%, un 98% ó un 99% a, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos descrita en la Tabla 1 puede determinarse convencionalmente usando programas de ordenador conocidos como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). El Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981)), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa el Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia concreta es, por ejemplo, idéntica al 95% a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente invención, los parámetros se fijan, por supuesto, de tal modo que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de nucleótidos de referencia, y se permite hasta un 5% de huecos en la homología sobre el número total de nucleótidos de la secuencia de referencia.

La presente solicitud está dirigida a moléculas de ácido nucleico que son idénticas al menos en un 95% a las secuencias de ácido nucleico descritas en la Tabla 1. El especialista en la técnica sabría como usar la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, como sonda de hibridación o como prímero de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los usos de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención incluyen, entre otros, (1) aislar genes estreptococales o variantes alélicas de los mismos a partir de una biblioteca de cADN o genómica, y (2) análisis Northern blot o PCR para la detección de expresión de mARN estreptococal.

Por supuesto, debido a la degeneración del código genético, el especialista en la técnica reconocerá inmediatamente que un elevado número de moléculas de ácido nucleico que presentan una secuencia con una identidad de al menos el 95% con una secuencia de ácido nucleico identificada en la Tabla 1 codificará el mismo polipéptido. De hecho, puesto que las variantes degeneradas de dichas secuencias de nucleótidos codifican todas el mismo polipéptido, esto será evidente para un especialista incluso sin realizar el ensayo de comparación descrito anteriormente.

También se reconocerá en la técnica que, para las moléculas de ácido nucleico que no son variantes degeneradas, un número razonable también codificarán proteínas que presentan epítopos antigénicos de los polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención. Esto se debe a que el especialista es plenamente consciente de las sustituciones de aminoácidos que son menos probables o que no son probables para afectar de forma significativa a la antigenicidad de un polipéptido (por ejemplo, la sustitución de un aminoácido en una región que no se cree que forme un epítopo antigénico). Por ejemplo, puesto que se han identificado epítopos antigénicos que contienen tan sólo seis aminoácidos (véase Harlow, y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, 2ª Edición; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva Cork (1988), página 76), en los casos en los que un polipéptido tiene múltiples epítopos antigénicos no sería de esperar que una alteración de varios residuos de aminoácido eliminara todos los epítopos antigénicos de dicho polipéptido. Esto se produce especialmente cuando las alteraciones son en regiones que se cree no constituyen epítopos antigénicos.

Vectores y células hospedantes

La presente invención también se refiere a vectores que incluyen las moléculas aisladas de ADN de la presente invención, a células hospedantes que son modificadas genéticamente con los vectores recombinantes, y a la producción de polipéptidos de *S. pneumoniae* o de fragmentos de los mismos mediante técnicas recombinantes.

Las construcciones recombinantes pueden introducirse en células hospedantes usando técnicas bien conocidas tales como infección, transducción, transfección, transvección, electroporación y transformación. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de fago, de plásmido, viral o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser de replicación competente o de replicación defectiva. En el último caso, la propagación vírica normalmente se produce únicamente en células hospedantes complementarias.

Los polinucleótidos se pueden unir a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un hospedante. Generalmente, se introduce un vector de plásmido en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, se puede empaquetar *in vitro* usando una línea celular de empaquetamiento apropiada y a continuación es transducido en células hospedantes.

Se prefieren los vectores que comprenden regiones de control que actúan como cis con respecto al polinucleótido de interés. Los factores de actuación trans apropiados pueden ser suministrados por el hospedante, suministrados por un vector complementario, o suministrados por el mismo vector al ser introducido en el hospedante.

En determinadas realizaciones preferidas a este respecto los vectores proporcionan una expresión específica, que puede ser inducible y/o específica del tipo de célula. En particular se prefieren los vectores que son inducibles por factores medioambientales que sean fáciles de manipular, tales como la temperatura y los aditivos nutrientes.

Los vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores derivados de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episomas de levadura, elementos cromosomales de levadura, virus tales como los baculovirus, los virus de papova, virus de vaccinia, adenovirus, virus de ave de corral, virus de seudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como cósmicos y fagémidos.

El injerto de ADN debería ser ligado operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor de fago lambda PL, los promotores lac, trp y tac de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40 y los promotores de LTRs retrovirales, por nombrar unos pocos. El especialista en la técnica conocerá otros promotores adecuados. Las construcciones de expresión contendrán además posiciones para el inicio de la transcripción, para la terminación y, en la región trascrita, una posición de unión de ribosoma para la traducción. La porción codificadora de los tránscritos maduros expresados por los constructos incluirá preferiblemente una posición de inicio de la traducción al principio y un codón de terminación (UAA, UGA ó UAG) posicionado apropiadamente en el extremo del polipéptido que va a ser traducido.

Tal como se ha indicado, los vectores de expresión incluirán preferiblemente al menos un marcador seleccionable. Dichos marcadores incluyen genes de resistencia a neomicina o a reductasa de dihidrofolato para el cultivo celular eucariótico, y genes de resistencia a tetraciclina o a ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de hospedantes apropiados incluyen, aunque no están limitados a ellos, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura; células de insecto tales como células de *Drosophila S2* y de *Spodoptera Sf9*; células de animales tales como células CHO, COS y de melanoma de Bowes; y células vegetales. Los medios de cultivo y las condiciones apropiadas para las anteriores células hospedantes son bien conocidos en la técnica.

Entre los vectores preferidos para su uso en bacterias se incluyen el pQE70, el pQE60 y el pQE-9, disponibles en Qiagen; los vectores de pBS, los vectores de Phasgescript, los vectores de Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A disponibles en Stratagene; la serie de vectores pET disponible en Novagen; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles en Pharmacia. Entre los vectores eucarióticos preferidos se encuentran pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles en Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Pharmacia. El especialista en la técnica podrá deducir fácilmente otros vectores adecuados.

Entre los promotores bacterianos conocidos adecuados para su uso en la presente invención se incluyen los promotores *lacl* y *lacZ* de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor *gpt*, los promotores lambda PR y PL y el promotor trp. Los promotores eucarióticos adecuados incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidita quinasa de HSV, los promotores temprano y tardío de SV40, los promotores de LTRs retrovirales, tales como los del virus de sarcoma de Rous (RSV), y los promotores de metal-lotioneína, tales como el promotor de metalotioneína-I de ratón.

La introducción de la construcción dentro de la célula hospedante se puede llevar a cabo mediante transfección de fosfato cálcico, mediante transfección mediada por DEAE-dextrano, mediante transfección mediada por lípido catiónico, mediante electroporación, transducción, infección u otros métodos. Dichos métodos se describen en multitud de manuales de laboratorio estándares (por ejemplo, Davis, y col., *Basic Methods In Molecular Biology* (1986)).

La transcripción de ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención mediante eucariontes superiores puede incrementarse insertando una secuencia potenciadota en el vector. Los potenciadotes son elementos de ADN que actúan como cis, normalmente aproximadamente de 10 a 30 pb que actúan para aumentar la actividad transcripcional de un promotor en un tipo de célula hospedante dado. Los ejemplos de potenciadotes incluyen el potenciador SV40, que está localizado en el extremo final del origen de replicación en los pb del 100 al 270, el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma del extremo final del origen de replicación, y potenciadotes de adenovirus.

Para la secreción del polipéptido traducido en el lúmen del retículo endoplasmático, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, se pueden incorporar señales de secreción apropiadas en el polipéptido expresado. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

El polipéptido se puede expresar en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no sólo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, se puede añadir una región adicional de aminoácidos, en concreto de aminoácidos cargados, al extremo N del polipéptido para mejorar la estabilidad y la persistencia en la célula hospedante, durante la purificación, o durante el posterior manejo y almacenamiento. Asimismo, se pueden añadir restos funcionales de péptido al polipéptido para facilitar la purificación.

Dichas regiones pueden eliminarse antes de la preparación final del polipéptido. La adición de restos funcionales de péptido a los polipéptidos para engendrar secreción o excreción, para mejorar la estabilidad y para facilitar la purificación, entre otras cosas, se realiza mediante técnicas rutinarias conocidas. Una proteína de fusión preferida comprende una región heteróloga de inmunoglobulina que es útil para solubilizar proteínas. Por ejemplo, el documento EP-A-O 464 533 (contrapartida canadiense 2045869) describe proteínas de fusión que comprenden varias porciones de región constante de moléculas de inmunoglobulina junto con otra proteína humana o parte de la misma. En muchos casos, la parte Fc de una proteína de fusión es muy ventajosa para su uso en terapia y diagnosis y, por tanto, da como resultado propiedades farmacocinéticas mejoradas (EP-A 0232 262). Por otro lado, para determinados usos sería deseable ser capaz de eliminar la parte Fc después de que la proteína de fusión haya sido expresada, detectada y purificada siguiendo el modo ventajoso descrito. Este es el caso cuando la porción Fc demuestra ser un impedimento para el uso en terapia y en diagnosis, por ejemplo cuando la proteína de fusión se va a usar como antígeno para inmunizaciones. En el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, las proteínas humanas, tales como el receptor hIL-5, han sido fusionadas con porciones Fc con el propósito de realizar ensayos de escrutinio de alta capacidad para identificar antagonistas de hIL-5. Véase Bennett, D. y col., *J. Molec. Recogn*. 8: 52-58 (1995) y Johanson, K. y col., *J. Biol. Chem.* 270 (16): 9459-9471 (1995).

Los polipéptidos de *S. pneumoniae* se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes empleando métodos bien conocidos que incluyen la precipitación en etanol o en sulfato amónico, la extracción con ácidos, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía con fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de afinidad, la cromatografía con hidroxilapatita, la cromatografía de lectina, y para la purificación se emplea cromatografía de líquidos de alta resolución ("HPLC"). Los polipéptidos de la presente invención incluyen productos purificados de forma natural, productos de procedimientos sintéticos químicos y productos obtenidos mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedante procarionte o eucarionte, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levaduras, de plantas superiores, de insecto y de mamífero.

Polipéptidos y fragmentos

La invención además proporciona polipéptidos aislados que presentan la secuencia de aminoácidos descrita en la Tabla 1, y mostrada como SEQ ID NO: 66, y continuada en la SEQ ID NO: 226, y péptidos y polipéptidos que comprenden porciones de los anteriores polipéptidos. Los términos "péptido" y "oligopéptido" se consideran sinónimos (situación comúnmente reconocida) y cada término puede ser usado de forma indiferente cuando el contexto requiera indicar una cadena de al menos dos aminoácidos acoplados por enlaces peptídicos. La palabra "polipéptido" se usa en la presente memoria para cadenas que contienen más de diez residuos de aminoácido. Todas las fórmulas o secuencias de oligopéptidos y polipéptidos usados en la presente memoria están escritas de izquierda a derecha y en la dirección desde el extremo amino hasta el extremo carboxi.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido de *S. pneumoniae* descrita en la Tabla 1 puede variar sin que se produzca un efecto significativo sobre la antigenicidad de los polipéptidos. Si se contemplan tales diferencias en la secuencia, debería recordarse que existen áreas críticas en el polipéptido que determinan la antigenicidad. En general, es posible sustituir residuos que no formen parte de un epítopo antigénico sin afectar de forma significativa a la antigenicidad de un polipéptido. En la Tabla 2 se proporciona una guía para dichas alteraciones ya que se remarcan los epítopos de cada polipéptido.

Los polipéptidos de la presente invención se proporcionan preferiblemente en forma aislada. Por "polipéptido aislado" se entiende un polipéptido extraído de su entorno nativo. Por tanto, un polipéptido producido y/o contenido dentro de una célula hospedante recombinante se considera aislado para los propósitos de la presente invención. También se entiende por "polipéptido aislado" un polipéptido que ha sido purificado, parcial o sustancialmente, a partir de una célula hospedante recombinante. Por ejemplo, las versiones producidas recombinantemente de los polipéptidos de *S. pneumoniae* descritas en la Tabla 1 se pueden purificar sustancialmente empleando un método de una sola etapa descrito por Smith y Jonson (*Gene* 67: 31-40 (1988)).

Los polipéptidos de la presente invención incluyen: (a) una secuencia de aminoácidos del polipéptido descrito en la Tabla 1; y (b) una secuencia de aminoácidos de una porción portadora de epítopo de los polipéptidos del apartado (a); así como polipéptidos con al menos un 95% de similitud con los descritos en (a) o en (b), así como polipéptidos que tengan una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en al menos un 95% a los anteriores.

Por "% de similitud" entre dos polipéptidos se entiende una puntuación de similitud obtenida al comparar las secuencias de aminoácidos de los dos polipéptidos usando el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) y los parámetros por defecto para determinar la similitud. El Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981)) para encontrar el mejor segmento de similitud entre dos secuencias.

Cuando se dice que un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos "idéntica" en al menos un 95% a una secuencia de aminoácidos de referencia de un polipéptido de *S. pneumoniae* se entiende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia excepto en que la secuencia del polipéptido puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácido por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos referencia. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos que sea idéntica en al menos un 95% a una

secuencia de aminoácidos de referencia, hasta un 5% de los residuos de aminoácido de la secuencia referencia pueden ser eliminados o sustituidos por otro aminoácido, o que se puede insertar en la secuencia de referencia un número de aminoácidos de hasta el 5% del total de residuos de aminoácido de la secuencia de referencia. Estas alteraciones en la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxi-terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia, o en cualquier posición entre dichas posiciones terminales, dispersas individualmente entre los residuos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos dentro de la secuencia de referencia.

La secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 1 presenta uno o más residuos "X". "X" representa residuo desconocido. Por tanto, para los propósitos de la definición de la identidad, si cualquier aminoácido está presente en la misma posición en una secuencia de aminoácidos de referencia (mostrada en la Tabla 1), en la que aparece X, las dos secuencias son idénticas en dicha posición.

A modo práctico, el hecho de que cualquier polipéptido concreto sea idéntico en al menos un 95% a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 1 puede determinarse convencionalmente usando programas de ordenador conocidos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Cuando se usa el Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia en concreto es idéntica, por ejemplo, en un 95% a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente invención, se fijan los parámetros, por supuesto, de tal modo que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia y que se permitan huecos en la homología de hasta un 5% del número total de residuos de aminoácido de la secuencia de referencia.

Tal como se describe más adelante, los polipéptidos de la presente invención también se pueden usar para activar anticuerpos policlonales y monoclonales, que son útiles en los ensayos dirigidos a la detección de expresión proteica estreptococal.

En otro aspecto, la invención proporciona péptidos y polipéptidos que comprenden porciones portadoras de epítopos de los polipéptidos de *S. pneumoniae* de la invención. Dichos epítopos son epítopos inmunogénicos o antigénicos de los polipéptidos de la invención. Un "epítopo inmunogénico" se define como una parte de una proteína que activa una respuesta de anticuerpos cuando la proteína completa o el polipéptido completo son el inmunógeno. Se cree que dichos epítopos inmunogénicos están confinados en unas pocas posiciones de la molécula. Por otro lado, se define una región de una molécula de proteína a la que se puede unir un anticuerpo como un "determinante antigénico" o "epítopo antigénico". El número de epítopos antigénicos en una proteína generalmente es inferior al número de epítopos antigénicos (Geysen, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3998-4002 (1983)). Los epítopos antigénicos predichos se muestran en la Tabla 2, presentada más adelante.

En relación a la selección de péptidos o polipéptidos que portan un epítopo antigénico (es decir, que contienen una región de una molécula de proteína a la cual se puede unir un anticuerpo), es bien sabido en la técnica que los péptidos sintéticos relativamente cortos que emulan parte de una secuencia de proteínas son capaces de provocar de forma rutinaria un antisuero que reacciona con la proteína emulada parcialmente (por ejemplo, Sutcliffe, J., y col., *Science* 219: 660-666 (1983)). Los péptidos capaces de provocar sueros reactivos de proteínas se representan frecuentemente en la secuencia primaria de una proteína, se pueden caracterizar por un conjunto de reglas químicas sencillas, y no están confinados ni en regiones inmunodominantes de proteínas intactas (es decir, epítopos inmunogénicos) ni en los extremos amino o carboxi. Los péptidos que son extremadamente hidrofóbicos y los de seis o menos residuos generalmente son ineficaces a la hora de inducir anticuerpos que se unan con la proteína emulada; los péptidos de mayor longitud, especialmente los que contienen residuos de prolina, normalmente son eficaces (Sutcliffe, y col., ver anterior, página 661). Por ejemplo, 18 de 20 péptidos diseñados de acuerdo con estas guías, que contienen 8-39 residuos que cubren el 75% de la secuencia de cadena del polipéptido de hemaglutinina HA1 del virus de la gripe, indujeron anticuerpos que reaccionaron con la proteína HA1 o con el virus intacto; y 12 de 12 péptidos procedentes de polimerasa MuLV, y 18 de 18 procedentes de glicoproteína de la rabia, indujeron anticuerpos que precipitaron las respectivas proteínas.

Por lo tanto, los péptidos y polipéptidos portadores de epítopos antigénicos de la invención son útiles para activar anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente a un polipéptido de la invención. De este modo, una elevada proporción de hibridomas obtenidos mediante fusión de células de bazo procedentes de donantes inmunizados con un péptido portador de epítopo antígeno generalmente segregan anticuerpos reactivos con la proteína nativa (Sutcliffe, y col., ver anterior, página 663). Los anticuerpos activados mediante péptidos o polipéptidos portadores de epítopos son útiles para detectar la proteína emulada, y se pueden usar anticuerpos de diferentes péptidos para seguir la evolución de diversas regiones de un precursor proteico que se ve sometido a un procesado post-traducción. Los péptidos y los anticuerpos antipéptido se pueden usar en una variedad de ensayos cualitativos o cuantitativos para detectar la proteína emulada, por ejemplo, ensayos de competición, ya que se ha demostrado que incluso los péptidos cortos (por ejemplo, de aproximadamente 9 aminoácidos) se pueden unir y desplazar los péptidos de mayor tamaño en los ensayos de inmunoprecipitacion (por ejemplo, Wilson, y col., *Cell* 37: 767-778 (1984), página 777). Los anticuerpos antipéptido de la invención también son útiles para la purificación de la proteína emulada, por ejemplo, mediante cromatografía de adsorción usando métodos bien conocidos en la técnica.

Los péptidos y polipéptidos portadores de epítopos de la invención diseñados de acuerdo con las anteriores guías preferiblemente contienen una secuencia de al menos siete aminoácidos, más preferiblemente de al menos nueve y aún

más preferiblemente de entre unos 15 y unos 30, contenidos dentro de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención. Sin embargo, los péptidos o polipéptidos que comprenden una porción mayor de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención, que contiene aproximadamente de 30 a 50 aminoácidos, o de cualquier longitud hasta la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención, también se consideran péptidos o polipéptidos portadores de epítopos de la invención y también son útiles para inducir anticuerpos que reaccionen con la proteína emulada. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del péptido portador de epítopos se selecciona para proporcionar una solubilidad sustancial en disolventes acuosos (es decir, la secuencia incluye residuos relativamente hidrofílicos, y preferiblemente se evitan las secuencias altamente hidrofóbicas); y se prefieren particularmente las secuencias que contienen residuos de prolina.

Los ejemplos no limitantes de polipéptidos o péptidos antigénicos que se pueden usar para generar anticuerpos específicos de *Streptococcus* incluyen porciones de la secuencia de aminoácidos identificada en la Tabla 1. Más específicamente, la Tabla 2 describe fragmentos específicos de polipéptidos de la presente invención, fragmentos antigénicos que comprenden secuencias de aminoácidos desde aproximadamente los primeros residuos de aminoácido indicados hasta aproximadamente el último residuo de aminoácido indicado para cada fragmento. Se cree que los fragmentos de polipéptido descritos en la Tabla 2 son regiones antigénicas de los polipéptidos de *S. pneumoniae* descritos en la Tabla 1. Por tanto, la invención incluye además péptidos y polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos de un epítopo mostrado en la Tabla 2 y polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos.

Los péptidos y polipéptidos que portan epítopos de la invención se pueden producir mediante cualquier medio convencional para la fabricación de péptidos o polipéptidos, incluyendo medios recombinantes que usan moléculas de ácido nucleico de la invención. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos portadora de epítopo de la presente invención puede fusionarse a un polipéptido de mayor tamaño que actúa como portador durante la producción recombinante y la purificación, así como durante la inmunización para producir anticuerpos antipéptido. Los péptidos portadores de epítopos también se pueden sintetizar usando métodos conocidos de síntesis química. Por ejemplo, Houghten ha descrito un método sencillo para la síntesis de un gran número de péptidos, tales como 10-20 mg de 248 péptidos diferentes de 13 residuos, que representan variantes de aminoácido sencillas de un segmento del polipéptido HA1 que fueron preparadas y caracterizadas (mediante estudios de unión tipo ELISA) en menos de cuatro semanas (Houghten, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5131-5135 (1985)). Este proceso de "Síntesis Simultánea Múltiple de Péptidos (SMPS)" se describe con más detalle en la Patente de EE.UU. Nº 4.631.211 a nombre de Houghten y colaboradores (1986). En este procedimiento, las resinas individuales correspondientes a la síntesis en fase sólida de varios péptidos están contenidas en paquetes separados permeables a disolvente, permitiendo un uso óptimo de las múltiples etapas repetitivas idénticas implicadas en los métodos en fase sólida. Un procedimiento completamente manual permite llevar a cabo de forma simultánea 500-1000 ó más síntesis (Houghten, y col., ver anterior, página 5134).

Los péptidos y polipéptidos portadores de epítopos de la invención se usan para inducir anticuerpos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, Sutcliffe y col., ver anterior; Wilson, y col., ver anterior; Chow, M., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 910-914; y Bittle, F. J., y col., *J. Gen. Virol.* 66: 2347-2354 (1985)). Generalmente, los animales se pueden inmunizar con péptidos libres; sin embargo, el título de anticuerpos anti-péptido puede mejorarse acoplando el péptido a un vehículo macromolecular, tal como la hemacianina de lapa de ojo de cerradura (KLH) o toxoide del tétanos. Por ejemplo, se pueden acoplar péptidos que contienen cisteína a un vehículo usando un ligando tal como el éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), mientras que otros péptidos pueden acoplarse a un vehículo usando un agente ligante más general, tal como el glutaraldehído. Animales tales como conejos, ratas y ratones se inmunizan tanto con péptidos libres como con péptidos acoplados a un vehículo, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal y/o intradermal de emulsiones que contienen aproximadamente 100 μg de péptido o de proteína vehículo y de adyuvante de Freund. Pueden ser necesarias varias inyecciones de activación, por ejemplo, a intervalos de aproximadamente dos semanas, para proporcionar un título útil de anticuerpos anti-péptido que pueda ser detectado, por ejemplo, mediante un ensayo ELISA usando péptidos libres adsorbidos sobre una superficie sólida. El título de anticuerpos anti-péptido en suero de animal inmunizado puede incrementarse mediante la selección de anticuerpos anti-péptido, por ejemplo, mediante adsorción del péptido sobre un soporte sólido y elución de los anticuerpos seleccionados de acuerdo a métodos bien conocidos en la técnica.

Los péptidos portadores de epítopos inmunogénicos de la invención, es decir, aquellas partes de una proteína que activan una respuesta de anticuerpos cuando la proteína completa es el inmunógeno, se identifican de acuerdo a métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Geysen, y col., ver anterior, describe un procedimiento para la síntesis simultánea rápida sobre soportes sólidos de cientos de péptidos de pureza suficiente para reaccionar en un ensayo inmunosorbente ligado a una enzima. De este modo, la interacción de los péptidos sintetizados con anticuerpos se detecta con facilidad sin separarlos del soporte. Así, un péptido que porta un epítopo inmunogénico de una proteína deseada puede ser identificado de forma rutinaria por un especialista de la técnica. Por ejemplo, el epítopo inmunológicamente importante de la proteína de recubrimiento del virus de la enfermedad píe-y-boca fue localizado por Geysen y col., ver anterior, con una resolución de siete aminoácidos mediante la síntesis de un conjunto solapado de todos los 208 posibles hexapéptidos que recubren la secuencia completa de 213 aminoácidos de la proteína. A continuación, se sintetizó un conjunto completo de sustitución de los péptidos, en el que todos los 20 aminoácidos fueron sustituidos a su vez en cada posición dentro del epítopo, y se determinaron los aminoácidos concretos que confieren especificidad para la reacción con el anticuerpo. De este modo, se pueden fabricar de forma rutinaria análogos peptídicos de los péptidos que portan epítopos de la invención empleando este método. La patente de EE.UU. Nº 4.708.781, a nombre

de Geysen (1987), describe con más detalle dicho método para la identificación de un péptido que porta un epítopo inmunogénico de una proteína deseada.

Es más, la Patente de EE.UU. Nº 5.194.392, a nombre de Geysen (1990), describe un método general para la detección o la determinación de una secuencia de monómeros (aminoácidos u otros compuestos) que es topológicamente equivalente al epítopo (es decir, un "mimótopo") que es complementaria a un parátopo concreto (posición de unión del antígeno) de un anticuerpo de interés. De forma más general, la Patente de EE.UU. Nº 4.433.092, también a nombre de Geysen (1989), describe un método para la detección o la determinación de una secuencia de monómeros que es un equivalente topográfico a un ligando que es complementario a la posición de unión de ligando de un receptor particular de interés. De forma similar, la Patente de EE.UU. Nº 5.480.971, a nombre de Houghten, R. A., y col., (1996), describe oligopéptidos prealquilados con alquilo-C_1-C_7 y conjuntos y bibliotecas de dichos péptidos, así como métodos para usar dichos conjuntos y bibliotecas de oligopéptidos para la determinación de la secuencia de un oligopéptido prealquilado que se une preferencialmente a una molécula aceptora de interés. Por tanto, los análogos no peptídicos de los péptidos portadores de epítopos de la invención también se pueden fabricar de forma rutinaria empleando estos métodos.

Como apreciará el especialista en la técnica, los polipéptidos de la presente invención y los fragmentos de los mismos que sean portadores de epítopos descritos anteriormente se pueden combinar con partes del dominio constante de inmunoglobulinas (IgG), dando como resultado polipéptidos quiméricos. Estas proteínas de fusión facilitan la purificación y muestran una vida media *in vivo* mejorada. Esto se ha demostrado, por ejemplo, para las proteínas quiméricas que consisten en los dos primeros dominios del polipéptido CD4 humano y en diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulinas de mamífero (EPA 0.394.827; Traunecker y col., *Nature 331:* 84-86 (1988)). Las proteínas de fusión que presentan una estructura dimérica ligada por disulfuros, debido a la parte de IgG, también pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas que no sean un polipéptido monomérico de *S. pneumoniae*, o un fragmento del mismo (Fountoulakis y col., *J. Biochem. 270*: 3958-3964 (1995)).

Ensayos diagnósticos

La presente invención se refiere además a un método para determinar la infección estreptococal en un animal a través de la detección de la expresión de genes que codifican polipéptidos estreptococales (por ejemplo, los polipéptidos descritos en la Tabla 1). Este método comprende analizar tejidos o fluidos corporales del animal en busca de anticuerpos específicos de *Streptococcus* o de ácidos nucleicos o proteínas estreptococales. El análisis del ácido nucleico específico de *Streptococcus* se puede realizar mediante PCR o mediante técnicas de hibridación que usan secuencias de ácido nucleico de la presente invención como sondas de hibridación o como prímeros (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, editado por Sambrook, Fritsch y Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Eremeeva y col., *J. Clin. Microbiol*. 32: 803-810 (1994) que describe la diferenciación entre especies de *Rickettsiae* de grupos de fiebre marcados mediante el análisis del polimorfismo de la longitud del fragmento de restricción de ADN amplificado mediante PCR). Los métodos para detectar ácidos nucleicos de *B. burgdorferi* vía PCR se describen, por ejemplo, en Chen y col., *J. Clin. Microbiol*. 32: 589-595 (1994).

En los casos en los que ya se ha realizado una diagnosis de un estado de enfermedad relacionado con *Streptococcus*, la presente invención es útil para monitorizar la progresión o la regresión del estado de enfermedad, ya que los pacientes que exhiban un aumento en la expresión génica de *Streptococcus* experimentarán un resultado clínico peor en comparación con los pacientes que expresen dicho(s) gen(es) a un nivel inferior.

Con la expresión "determinar la infección estreptococal en un animal a través de la detección de genes que codifican polipéptidos estreptococales" se pretende indicar la medición, o la estimación, cualitativa o cuantitativa del nivel de uno o más polipéptidos de *Streptococcus* o del nivel de ácido nucleico que codifica polipéptidos de *Streptococcus* en una primera muestra biológica directamente (por ejemplo, mediante la determinación o estimación del nivel absoluto de proteína o de ácido nucleico) o relativamente (por ejemplo, mediante la comparación del nivel de polipéptido de *Streptococcus* o del nivel de mARN en una segunda muestra biológica). El nivel de polipéptido de *Streptococcus* o el nivel de ácido nucleico de la segunda muestra usada para una comparación relativa puede ser indetectable si se obtiene a partir de un animal que no está infectado con *Streptococcus*. Cuando se monitoriza la progresión o la regresión de un estado de enfermedad, el nivel de polipéptido de *Streptococcus* o el nivel de ácido nucleico se puede comparar con una segunda muestra obtenida a partir de un animal infectado con *Streptococcus* o del mismo animal del que se obtuvo la primera muestra, pero extrayéndola de dicho animal a un tiempo distinto a cuando se extrajo la primera. Como se apreciará en la técnica, una vez que se conoce un nivel estándar de polipéptido de *Streptococcus* o de nivel de ácido nucleico que se corresponde con una etapa concreta de una infección de *Streptococcus*, se puede usar repetidamente como patrón para la comparación.

Por "muestra biológica" se entiende cualquier muestra biológica obtenida de un animal, línea celular, cultivo de tejido, u otra fuente que contenga polipéptido, mARN ó ADN de *Streptococcus*. Las muestras biológicas incluyen fluidos corporales (tales como plasma y fluido sinovial) que contienen polipéptidos de *Streptococcus*, y tejidos musculares, de piel y de cartílagos. Los métodos para obtener biopsias de tejidos y fluidos corporales son bien conocidos en la técnica.

La presente invención es útil para detectar enfermedades relacionadas con infecciones de *Streptococcus* en animales. Los animales preferidos incluyen monos, simios, gatos, perros, vacas, cerdos, ratones, caballos, conejos y humanos.

El ARN total se puede aislar de una muestra biológica usando cualquier técnica adecuada, tal como el método de una etapa de guanidinio-tiocianato-fenol-cloroformo descrito en Chomczynski y Sacchi, *Anal. Biochem. 162*: 156-159 (1987). A continuación se evalúa el mARN que codifica polipéptidos de *Streptococcus* que tienen una homología suficiente con las secuencias de ácido nucleico identificadas en la Tabla 1, para permitir la hibridación entre las secuencias complementarias, usando cualquier método apropiado. Esto incluye el análisis Northern blot, el mapeado de nucleasa 1, la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la transcripción inversa en combinación con la reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR), y la transcripción inversa en combinación con la reacción en cadena de ligasa (RT-LCR).

El análisis de Northern blot se puede realizar como se describe en Harada y col., *Cell 63*: 303-312 (1990). Resumiendo, el ARN total se prepara a partir de una muestra biológica tal como se ha descrito anteriormente. Para el Northern blot, el ARN se desnaturaliza en un tampón apropiado (tal como tampón de glioxal /dimetilsulfóxido/ fosfato sódico), se somete a electroforesis en gel de agarosa, y se transfiere a un filtro de nitrocelulosa. Después de que los ARNs han sido ligados al filtro mediante un ligando UV, el filtro se pre-hibrida en una disolución que contiene formamida, SSC, disolución de Denhardt, esperma de salmón desnaturalizado, SDS y tampón de fosfato sódico. Como sonda se usa una secuencia de ADN de polipéptido de *S. pneumoniae* mostrada en la Tabla 1, marcada de acuerdo con cualquier método apropiado (tal como el sistema de marcado de ADN multi-imprimado con ^{32}P (Amersham)). Tras producirse la hibridación a lo largo de la noche, el filtro se lava y se expone a película de rayos-X. El ADN para uso como sonda de acuerdo con la presente invención se describe en las anteriores secciones, y preferiblemente tendrá una longitud de al menos 15 pb.

El mapeado de S1 se puede llevar a cabo como se describe en Fujita y col., *Cell 49*: 357-367 (1987). Para preparar ADN sonda para su uso en el mapeado de S1, se usa la cadena sentido de una secuencia de ADN de *S. pneumoniae* descrita anteriormente de la presente invención como molde para sintetizar ADN antisentido marcado. A continuación, el ADN antisentido puede ser digerido usando una endonucleasa de restricción apropiada para generar más sondas de ADN con una longitud deseada. Dichas sondas antisentido son útiles para visualizar bandas protegidas correspondientes al mARN objetivo (es decir, mARN que codifica polipéptidos de *Streptococcus*).

Preferiblemente, los niveles de mARN que codifican polipéptidos de *Streptococcus* se determinan usando el método RT-PCR descrito por Makino y col., *Technique 2:* 295-301 (1990). Empleando este método, se relacionan linealmente las radiactividades de los "amplicones" de las bandas de gel de poliacrilamida con la concentración inicial del mARN objetivo. En resumen, este método incluye la adición de ARN total aislado de una muestra biológica en una mezcla de reacción que contiene un prímero RT y un tampón apropiado. Tras realizar una incubación de envejecimiento del prímero, la mezcla se puede complementar con un tampón RT, dNTPs, DTT, inhibidor de ARNasa y transcriptasa inversa. Tras la incubación para lograr la transcripción inversa del ARN, los productos RT son sometidos a PCR usando prímeros marcados. De forma alternativa, en lugar de marcar los prímeros, se puede incluir un dNTP marcado en la mezcla de reacción de PCR. La amplificación por PCR se puede llevar a cabo en un ciclador térmico de ADN siguiendo técnicas convencionales. Tras un número adecuado de rondas para lograr la amplificación, la mezcla de reacción de PCR se somete a electroforesis sobre gel de poliacrilamida. Tras secar el gel, se cuantifica la radiactividad de las bandas apropiadas (correspondientes al mARN que codifica los polipéptidos de *Streptococcus*) usando un analizador de imágenes. En la técnica se conocen bien los ingredientes y las condiciones de las reacciones de RT y de PCR, y los reactivos y las concentraciones de gel, y los métodos de marcado. El especialista en la técnica apreciará las variaciones evidentes del método RT-PCR.

La determinación de los niveles de polipéptido de *Streptococcus* en una muestra biológica se puede realizar usando cualquier método conocido en la técnica. Para la determinación de niveles de polipéptido de *Streptococcus* de una muestra biológica se prefieren las técnicas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, la expresión de polipéptido de *Streptococcus* en tejidos se puede estudiar empleando métodos inmunohistológicos clásicos. En dichos métodos, el reconocimiento específico lo proporciona el anticuerpo primario (policlonal o monoclonal), pero el sistema de detección secundario puede utilizar anticuerpos fluorescentes, enzimáticos, u otros anticuerpos secundarios conjugados. Como resultado, se obtiene una tinción inmunohistológica de la sección de tejido correspondiente al examen patológico. También se pueden extraer tejidos, por ejemplo, con urea y detergente neutro, para la liberación de polipéptidos de *Streptococcus* para el ensayo de Western blot o de dot/spot (Jalkanen, M., y col., *J. Cell. Biol.* 101: 976-985 (1985); Jalkanen, M. y col., *J. Cell. Biol.* 105: 3087-3096 (1987)). En esta técnica, que se basa en el uso de fases sólidas catiónicas, la cuantificación de un polipéptido de *Streptococcus* se puede lograr usando un polipéptido de *Streptococcus* aislado como patrón. Esta técnica también se puede aplicar a fluidos corporales.

Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de polipéptido de *Streptococcus* incluyen los inmunoensayos, tales como el ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos monoclonales específicos de polipéptido de *Streptococcus* como inmunosorbentes y como sonda marcada con enzima para detectar y cuantificar un polipéptido de *Streptococcus*. La cantidad de polipéptido de *Streptococcus* presente en la muestra se puede calcular haciendo referencia a la cantidad presente en una preparación patrón usando un algoritmo de ordenador de regresión lineal. Un ensayo ELISA para detectar un antígeno tumoral se describe en Iacobelli y col., *Breast Cancer Research and Treatment 11*: 19-30 (1988).

En otro ensayo ELISA, se pueden usar dos anticuerpos monoclonales específicos distintos para detectar polipéptidos de *Streptococcus* en un fluido corporal. En este ensayo, uno de los anticuerpos se usa como inmunosorbente y el otro como sonda marcada con enzima.

Las anteriores técnicas se pueden llevar a cabo esencialmente como un ensayo de "una etapa" o de "dos etapas". El ensayo de "una etapa" implica poner en contacto el polipéptido de *Streptococcus* con anticuerpo inmovilizado y, sin lavar, poner en contacto la mezcla con el anticuerpo marcado. El ensayo de "dos etapas" implica lavar antes de poner en contacto la mezcla con el anticuerpo marcado. También se pueden emplear otros métodos convencionales como adecuados. Normalmente es deseable inmovilizar un componente del sistema de ensayo sobre un soporte, permitiendo con ello que otros componentes del sistema entren en contacto con el componente y sean fácilmente eliminados de la muestra.

Los anticuerpos específicos de polipéptidos de *Streptococcus* para su uso en la presente invención se pueden activar contra un polipéptido intacto de *S. pneumoniae* de la presente invención, o contra un fragmento del mismo. Dichos polipéptidos y fragmentos pueden administrarse a un animal (por ejemplo, un conejo o un ratón) con un vehículo proteico (por ejemplo, albúmina) o, si son suficientemente largos (por ejemplo, de al menos aproximadamente 25 aminoácidos), sin vehículo.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" (Ab) o "anticuerpo monoclonal" (Mab) pretende incluir moléculas intactas, así como fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y $F(ab')_2$), que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido de *Streptococcus*. Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se eliminan más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos unión a tejido no específica de un anticuerpo intacto (Wahl y col., *J. Nucl. Med. 24*: 316-325 (1983)). Por tanto, se prefieren dichos fragmentos.

Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar mediante cualquiera de una serie de métodos. Por ejemplo, los polipéptidos de *S. pneumoniae* identificados en la Tabla 1, o los fragmentos de los mismos, se pueden administrar a un animal con el fin de inducir la producción de sueros que contengan anticuerpos policlonales. En un método preferido, se prepara una preparación de polipéptido de *S. pneumoniae* de la presente invención y se purifica para dejarla sustancialmente libre de contaminantes naturales. A continuación, dicha preparación se introduce en un animal con el propósito de producir antisueros policlonales de actividad altamente específica.

En el método más preferido, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales. Dichos anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando tecnología de hibridoma (Kohler y col., *Nature 256:* 495 (1975); Kohler y col., *Eur. J. Immunol. 6:* 511 (1976); Kohler y col., *Eur. J. Immunol. 6*: 292 (1976); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y.*, (1981), páginas 563-681). En general, dichos procedimientos implican inmunizar un animal (preferiblemente un ratón) con un polipéptido antigénico de *S. pneumoniae* de la presente invención. Las células adecuadas se pueden reconocer por su capacidad para unirse a anticuerpos de polipéptido anti-*Streptococcus*. Dichas células pueden cultivarse en cualquier medio de cultivo de tejidos adecuado; sin embargo, es preferible cultivar células en medio Eagle de Earle modificado complementado con un 10% de suero fetal bovino (desactivado a aproximadamente 56ºC), y complementado con aproximadamente 10 g/L de aminoácidos no esenciales, aproximadamente 1.000 U/mL de penicilina, y aproximadamente 100 μg/mL de estreptomicina. Los esplenocitos de dichos ratones se extraen y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada. Se puede emplear cualquier línea celular de mieloma adecuada de acuerdo con la presente invención; sin embargo, es preferible emplear la línea celular de mieloma original (SP_2O), disponible en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Tras la fusión, las células de hibridoma resultantes se mantienen selectivamente en medio HAT, y a continuación se clonan limitando la dilución tal como se describe en Wands y col. (*Gastroenterology 80:* 225-232 (1981)). Las células de hibridoma obtenidas a través de dicha selección se evalúan entonces para identificar clones que segreguen anticuerpos capaces de unirse al antígeno de polipéptido de *Streptococcus* administrado al animal inmunizado.

De forma alternativa, se pueden producir anticuerpos adicionales capaces de unirse a antígenos de polipéptido de *Streptococcus* en un procedimiento de dos etapas mediante el uso de anticuerpos anti-idiotípicos. Dicho método se basa en el hecho de que los anticuerpos son en sí mismos antígenos, y que, por tanto, es posible obtener un anticuerpo que se una a un segundo anticuerpo. De acuerdo con este método, los anticuerpos específicos de polipéptido de *Streptococcus* se usan para inmunizar un animal, preferiblemente un ratón. Los esplenocitos de dicho animal se usan a continuación para producir células de hibridoma, y las células de hibridoma se monitorizan para identificar clones que produzcan un anticuerpo cuya capacidad para unirse al anticuerpo específico de polipéptido de *Streptococcus* puede ser bloqueado por un antígeno de polipéptido de Streptococcus. Dichos anticuerpos comprenden anticuerpos anti-idiotípicos de los anticuerpos específicos de polipéptido de *Streptococcus* y se pueden usar para inmunizar a un animal para inducir la formación de más anticuerpos específicos de polipéptido de *Streptococcus*.

Cabe destacar que el Fab y el $F(ab')_2$ y otros fragmentos de los anticuerpos de la presente invención pueden usarse de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Dichos fragmentos se producen normalmente por ruptura proteolítica, usando enzimas tales como la papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos $F(ab')_2$). De forma alternativa, se pueden producir fragmentos de unión de polipéptido de *Streptococcus* mediante la aplicación de tecnología recombinante de ADN o empleando química sintética.

De especial interés para la presente invención son los anticuerpos de antígenos de polipéptidos de *Streptococcus* que se producen en humanos, o que son "humanizados" (es decir, que son no inmunogénicos en un humano) mediante tecnología recombinante o de otro tipo. Los anticuerpos humanizados se pueden producir, por ejemplo, reemplazando una porción inmunogénica de un anticuerpo con una porción correspondiente que sea no inmunogénica (es decir, anticuerpos quiméricos) (Robinson, R.R. y col., Publicación de Patente Internacional PCT/US86/02269; Akira, K. y col., Solicitud de Patente Europea 184.187; Taniguchi, M., Solicitud de Patente Europea 171.496; Morrison, S.L. y col., Solicitud de Patente Europea 173.494; Neuberger, M.S. y col., Solicitud PCT WO 86/01533; Cabilly, S. y col., Solicitud de Patente Europea 125.023; Better, M. y col., *Science 240:* 1041-1043 (1988); Liu, A.Y. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84*: 3439-3443 (1987); Liu, A.Y. y col., *J. Immunol. 139*: 3521-3526 (1987); Sun, L.K. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:* 214-218 (1987); Nishimura, Y., y col., *Canc. Res. 47:* 999-1005 (1987); Wood, C.R. y col., *Nature 314:* 446-449 (1985)); Shaw y col., *J. Natl. Cancer Inst. 80*: 1553-1559 (1988). Revisiones generales sobre anticuerpos quiméricos "humanizados" se pueden encontrar en Morrison, S.L. (*Science, 229*: 1202-1207 (1985)) y en Oi, V.T. y col., *BioTechniques 4:* 214 (1986)). Los anticuerpos "humanizados" adecuados se pueden producir de forma alternativa mediante CDR o mediante sustitución CEA (Jones, P.T. y col., *Nature 321:* 552-525 (1986); Verhoeyan y col., *Science 239:* 1534 (1988); Beidler, C.B. y col., *J. Immunol. 141:* 4053-4060 (1988)).

Las marcas enzimáticas adecuadas incluyen, por ejemplo, aquellas del grupo oxidasa, que cataliza la producción de peróxido de hidrógeno reaccionando con el sustrato. Particularmente se prefiere la glucosa oxidasa, ya que presenta una buena estabilidad y su sustrato (glucosa) es fácilmente adquirible. La actividad de una marca de oxidasa se puede determinar midiendo la concentración de peróxido de hidrógeno formado en la reacción anticuerpo marcado enzimáticamente/sustrato. Además de las enzimas, otras marcas adecuadas incluyen marcas de radioisótopos, tales como el yodo (^{125}I, ^{121}I), el carbono (^{14}C), el azufre (^{35}S), el tritio (^{3}H), el indio (^{112}In) y el tecnecio ^{99m}Tc), y marcas fluorescentes, tales como la fluoresceína y la rodamina, y la biotina.

A continuación se presentan otras marcas adecuadas para los anticuerpos específicos de polipéptido de *Streptococcus* de la presente invención. Los ejemplos de marcas enzimáticas adecuadas incluyen deshidrogenasa de malato, nucleasa estafilococal, isomerasa de delta-5-esteroide, deshidrogenasa de alcohol de levadura, deshidrogenasa de fosfato de alfa-glicerol, isomerasa de fosfato de triosa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato, glucoamilasa y esterasa de acetilcolina.

Los ejemplos de marcas radioisotópicas adecuadas incluyen ^{3}H, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I, ^{32}P, ^{35}S, ^{14}C, ^{51}Cr, ^{57}To, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{75}Se, ^{152}Eu, ^{90}Y, ^{67}Cu, ^{217}Ci, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{47}Sc, ^{109}Pd, etc. El ^{111}In es un isótopo preferido cuando se emplean imágenes *in vivo* ya que evita el problema de la deshalogenización de los anticuerpos monoclonales marcados con ^{125}I o con ^{131}In por el hígado. Además, este radionucleótido tiene una energía de emisión gamma más favorable para la captación de imágenes (Perkins y col., *Eur. J. Nucl. Med. 10:* 296-301 (1985); Carrasquillo y col., *J. Nucl. Med. 28*: 281-287 (1987)). Por ejemplo, el ^{111}In acoplado a anticuerpos monoclonales con 1-(P-isotiocianatobencil)-DPTA presenta poca captación en tejidos no tumorales, particularmente en el hígado, y por tanto potencia la especificidad de la localización del tumor (Esteban y col., J. Nucl. Med. 28: 861-870 (1987)).

Los ejemplos de marcadores isotópicos no radiactivos incluyen ^{157}Gd, ^{55}Mn, ^{162}Dy, ^{52}Tr y ^{56}Fe.

Los ejemplos de marcadores fluorescentes adecuados incluyen un marcador de ^{152}Eu, un marcador de fluoresceína, un marcador de isotiocianato, un marcador de rodamina, un marcador de ficoeritrina, un marcador de ficocianina, un marcador de aloficocianina, un marcador de o-ftalaldehído y un marcador de fluorescamina.

Los ejemplos de marcadores de toxina adecuados incluyen la toxina de la difteria, el ricino y la toxina del cólera.

Los ejemplos de marcadores quimioluminiscentes incluyen un marcador luminal, un marcador isoluminal, un marcador de éster de acridinio aromático, un marcador de imidazol, un marcador de sal de acridinio, un marcador de éster de oxalato, un marcador de luciferina, un marcador de luciferasa y un marcador de aecuorina.

Los ejemplos de agentes de contraste de resonancia magnética nuclear incluyen núcleos pesados tales como Gd, Mn y hierro.

Las técnicas típicas para la unión de los marcadores anteriormente descritos a anticuerpos se proporcionan en Kennedy y col., *Clin. Chim. Acta 70:* 1-31 (1976), y en Schurs y col., *Clin. Chim. Acta 81:* 1-40 (1977). Las técnicas de acoplamiento mencionadas en la última referencia son el método del glutaraldehído, el método del peryodato, el método de la dimaleimida, el método del éster de m-maleimidobencil-N-hidroxi-succinimida, todos los cuales se incorporan a la presente memoria a modo de referencia.

En un aspecto relacionado, la invención incluye un kit de diagnóstico para su uso en el escrutinio de sueros que contienen anticuerpos específicos contra la infección de *S. pneumoniae*. Dicho kit puede incluir un antígeno de *S. pneumoniae* aislado que comprende un epítopo que es específicamente inmunorreactivo con al menos un anticuerpo anti-S. pneumoniae. Dicho kit también incluye los medios necesarios para detectar la unión de dicho anticuerpo al antígeno. En realizaciones específicas, el kit puede incluir un antígeno de péptido o de polipéptido sintetizado químicamente o producido recombinantemente. El antígeno de péptido o de polipéptido puede estar ligado a un soporte sólido.

En una realización más específica, el medio de detección del kit anterior incluye un soporte sólido al cual se une dicho antígeno de péptido o de polipéptido. Dicho kit también puede incluir un anticuerpo anti-humano marcado con informador no ligado. En esta realización, la unión del anticuerpo con el antígeno de *S. pneumoniae* se puede detectar mediante la unión del anticuerpo marcado con informador con el anticuerpo anti-*S. pneumoniae*.

En un aspecto relacionado, la invención incluye un método para detectar infección de *S. pneumoniae* en un sujeto. Este método de detección incluye hacer reaccionar un fluido corporal, preferiblemente suero, del sujeto con un antígeno de *S. pneumoniae* aislado, y examinar el antígeno en busca de la presencia de anticuerpos ligados. En una realización específica, el método incluye un antígeno de polipéptido unido a un soporte sólido, y se hace reaccionar suero con el soporte. Posteriormente, el soporte se hace reaccionar con un anticuerpo anti-humano marcado con informador. A continuación el soporte es examinado en busca de la presencia de anticuerpos marcados con informador. El reactivo de superficie sólida empleado en los anteriores ensayos y kits se prepara empleando técnicas conocidas para la unión de material proteico a un material de soporte sólido, tal como partículas poliméricas, barras de mojado, placas de 96 pocillos o material filtrante. Estos métodos de unión generalmente incluyen la adsorción no específica de la proteína al soporte o la unión covalente de la proteína, normalmente a través de un grupo amino libre, a un grupo químicamente reactivo del soporte sólido, tal como un grupo carboxilo, hidroxilo o aldehído activado. De forma alternativa, se pueden usar placas recubiertas de estreptavidina junto con el(los) antígeno(s) biotinilado(s).

Terapia y modos de administración

La presente invención también proporciona vacunas que comprenden uno o más polipéptidos de la presente invención. La heterogeneicidad en la composición de una vacuna puede ser proporcionada mediante la combinación de polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención. Las vacunas multicomponentes de este tipo son deseables debido que es probable que sean más eficaces a la hora de activar respuestas inmunes protectoras contra especies múltiples y contra cepas del género *Streptococcus* que las vacunas de polipéptidos sencillos. Por tanto, tal como se discute más adelante en detalle, una vacuna multicomponente de la presente invención puede contener uno o más, preferiblemente de 2 a aproximadamente 20, más preferiblemente de 2 a aproximadamente 15, y aún más preferiblemente de 3 a aproximadamente 8, de los péptidos de *S. pneumoniae* identificados en la Tabla 1, o fragmentos de los mismos.

Las vacunas multicomponentes son conocidas en la técnica para activar la producción de anticuerpos contra numerosos componentes inmunogénicos. Decker, M. y Edwards, K., *J. Infect. Dis. 174:* S270-275 (1996). Además, recientemente se ha demostrado que una vacuna tetravalente, contra la hepatitis B, la difteria, el tétanos y el pertussis, activa niveles protectores de anticuerpos en infantes humanos contra los cuatro agentes patógenos. Aristegui, *J. y col., Vaccine 15*: 7-9 (1997).

Por tanto, la presente invención también incluye vacunas multicomponentes. Dichas vacunas comprenden más de un polipéptido, inmunógeno o antígeno. Un ejemplo de dicha vacuna multicomponente sería una vacuna que comprende más de uno polipéptido de *S. pneumoniae* descrito en la Tabla 1.

Tal como se ha indicado anteriormente, se espera que las vacunas de la presente invención provoquen una respuesta inmune protectora contra infecciones causadas por especies y cepas de *Streptococcus* diferentes a la cepa de *S. pneumoniae* depositada en la ATCC.

También dentro del alcance de la invención se encuentran las células enteras y las vacunas víricas enteras. Dichas vacunas pueden producirse recombinantemente e implican la expresión de uno o más polipéptidos de *S. pneumoniae* descritos en la Tabla 1. Por ejemplo, los polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención pueden ser segregados o localizados intracelularmente, sobre la superficie celular o en el espacio periplásmico. Además, si se usa un virus recombinante, los polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención pueden localizarse, por ejemplo, en el envoltorio vírico, sobre la superficie de la cápsida, o internamente dentro de la cápsida. Las vacunas celulares enteras que emplean células que expresan proteínas heterólogas son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Robinson, K. y col., *Nature Biotech. 15:* 653-657 (1997); Sirard, J. y col., *Infect. Immun. 65:* 2029-2033 (1997); Chabalgoity, J. y col., *Infect. Immun. 65:* 2402-2412 (1997). Estas células pueden administrarse vivas o pueden matarse antes de la administración. Chabalgoity, J. y col., ver anterior, por ejemplo, publicaron el uso con éxito en ratones de una cepa de vacuna de *Salmonella* viva atenuada que expresa una porción de una proteína de unión a ácido graso de platihelminto como una proteína de fusión sobre su superficie celular.

También se puede preparar una vacuna multi-componente usando técnicas conocidas mediante la combinación de uno o más polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención, o de fragmentos de los mismos, con componentes no estreptococales adicionales (por ejemplo, toxina de difteria o toxina del tétanos, y/u otros compuestos que provocan una respuesta inmune). Dichas vacunas son útiles para activar respuestas inmunes protectoras frente a miembros del género *Streptococcus* y frente a agentes patógenos no estreptococales.

Las vacunas de la presente invención también incluyen vacunas de ADN. Actualmente, se están desarrollando vacunas de ADN para una serie de enfermedades infecciosas. Boyer, J. y col., *Nat. Med. 3:* 526-532 (1997); revisado en Spier, R., Vaccine 14: 1285-1288 (1996). Dichas vacunas de ADN contienen una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención orientados de un modo que permite la expresión del polipéptido sujeto. Se ha demostrado que la administración directa de ADN plásmido que codifica

OspA de *B. burgdorgeri* provoca una inmunidad protectora en ratones frente a exposición borrelial. Luke, C. y col., *J. Infect. Dis. 175*: 91-97 (1997).

La presente descripción también se refiere a la administración de una vacuna que es administrada junto con una molécula capaz de modular respuestas inmunes. Kim, J. y col., *Nature Biotech. 15:* 641-646 (1997), por ejemplo, publican la potenciación de respuestas inmunes producidas por inmunizaciones de ADN cuando se administran conjuntamente secuencias de ADN que codifican moléculas que estimulan la respuesta inmune. De un modo similar, las vacunas de la presente invención pueden administrarse conjuntamente con ácidos nucleicos que codifican moduladores inmunes o con los propios moduladores inmunes. Estos moduladores inmunes incluyen el factor estimulador de colonia de macrófagos de granulocito (GM-CSF) y CD86.

Las vacunas de la presente invención se pueden usar para conferir resistencia frente a la infección estreptococal mediante una inmunización pasiva o activa. Cuando las vacunas de la presente invención se usan para conferir resistencia frente a la infección estreptococal a través de una inmunización activa, se administra una vacuna de la presente invención a un animal para provocar una respuesta inmune protectora que previene o atenúa una infección estreptococal. Cuando la vacuna de la presente invención se usa para conferir resistencia frente a una infección estreptococal a través de una inmunización pasiva, la vacuna se proporciona a un animal hospedante (por ejemplo, humano, perro o ratón), y los antisueros activados por este antisuero se recuperan y se proporcionan directamente a un receptor que se sospecha tiene una infección causada por un miembro del género *Streptococcus*.

La capacidad para marcar anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, con moléculas de toxinas proporciona un método adicional para tratar infecciones estreptococales cuando se lleva a cabo una inmunización pasiva. En esta realización, los anticuerpos, o los fragmentos de anticuerpos, capaces de reconocer los polipéptidos de *S. pneumoniae* descritos en la presente memoria, o fragmentos de los mismos, así como otras proteínas de *Streptococcus*, se marcan con moléculas de toxina antes de ser administrados al paciente. Cuando los anticuerpos derivados de dicha toxina se unen a las células de *Streptococcus*, los restos funcionales de toxina se localizarán en estas células y provocarán su muerte.

Por tanto, la presente invención se refiere y proporciona un medio para la prevención o la atenuación de una infección estreptococal que es originada por organismos que presentan antígenos que son reconocidos y se unen a antisueros producidos en respuesta a los polipéptidos de la presente invención. Tal como se usa en la presente memoria, se dice que una vacuna previene o atenúa una enfermedad si su administración a un animal da como resultado la atenuación parcial o total (es decir, la supresión) de un síntoma o condición de la enfermedad, o la inmunidad total o parcial del animal frente a al enfermedad.

La administración de la vacuna (o del antisuero que provoca) se puede realizar con un propósito "profiláctico" o con uno "terapéutico". Cuando se proporciona profilácticamente, el(los) compuesto(s) se proporciona(n) antes de que aparezca cualquier síntoma de infección estreptococal. La administración profiláctica de el(los) compuesto(s) sirve para prevenir o atenuar cualquier infección posterior. Cuando se proporciona(n) terapéuticamente, el(los) compuesto (s) se proporcionan cuando se produce la detección de síntomas que indican que un animal puede estar infectado con un miembro del género *Streptococcus*. La administración terapéutica de el(los) compuesto(s) sirve para atenuar cualquier infección real. Por tanto, los polipéptidos de *S. pneumoniae*, y los fragmentos de los mismos, de la presente invención se pueden proporcionar antes del inicio de la infección (para prevenir o para atenuar una infección anticipada) o después del inicio de una infección real.

Los polipéptidos de la invención, tanto si codifican una porción de una proteína nativa o un derivado funcional de la misma, se pueden administrar en forma pura o pueden acoplarse a un vehículo macromolecular. Ejemplos de dichos vehículos son las proteínas y los carbohidratos. Las proteínas adecuadas que pueden actuar como vehículo macromolecular para potenciar la inmunogenicidad de los polipéptidos de la presente invención incluyen el toxoide del tétanos de la hemacianina de lapa de ojo de cerradura (KLH), la toxina pertussis, la albúmina de suero bovino y la ovoalbúmina. Los métodos para acoplar los polipéptidos de la presente invención a dichos vehículos macromoleculares se describen en Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual, 2ª Edición*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988), cuya descripción completa se incorpora a la presente memoria a modo de referencia.

Se dice que una composición es "farmacológicamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un animal receptor, y por lo demás es adecuada para la administración a dicho animal. Se dice que dicho agente se va a administrar en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un paciente receptor.

Aunque en todos los casos la vacuna de la presente invención se administra como un compuesto farmacológicamente aceptable, el especialista en la técnica reconocerá que la composición de un compuesto farmacológicamente aceptable varía con el animal al que se administra. Por ejemplo, una vacuna destinada a uso humano generalmente no será administrada conjuntamente con un adyuvante de Freund. Además, el nivel de pureza de los polipéptidos de *S. pneumoniae* de la presente invención normalmente será superior cuando se administren a un humano que cuando se administren a un animal no humano.

Como comprenderá el especialista en la técnica, cuando la vacuna de la presente invención se proporciona a un animal, puede estar en una composición que puede contener sales, tampones, adyuvantes u otras sustancias que son deseables para mejorar la eficacia de la composición. Los adyuvantes son sustancias que pueden usarse para aumentar específicamente una respuesta inmune específica. Generalmente, estas sustancias realizan dos funciones: (1) protegen a el(los) antígeno(s) de ser catabolizado(s) rápidamente después de la administración y (2) estimulan respuestas inmunes de forma no específica.

Normalmente, el adyuvante y la composición se mezclan antes de la presentación al sistema inmune, o se presentan separadamente, pero en la misma zona del animal que es inmunizado. Los adyuvantes se pueden clasificar a grandes rasgos en varios grupos en base a su composición. Estos grupos incluyen los adyuvantes oleaginosos (por ejemplo, el de Freund, completo e incompleto), sales minerales (por ejemplo, $AlK(SO_4)_2$, $AlNa(SO_4)_2$, $AlNH_4(SO_4)$, sílice, caolín y carbón), polinucleótidos (por ejemplo, ácidos poli IC y pli AU), y determinadas sustancias naturales (por ejemplo, cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, así como sustancias que se encuentran en *Corynebacterium parvum*, o en *Bordetella pertussis*, y miembros del género *Brucella*). Otras sustancias útiles como adyuvantes son las saponinas tales como, por ejemplo, Quil A. (Superfos A/S, Dinamarca). Los adyuvantes preferidos para su uso en la presente invención incluyen sales de aluminio, tales como $AlK(SO_4)_2$, $AlNa(SO_4)_2$ y $AlNH_4(SO_4)$. Los ejemplos de materiales adecuados para su uso en composiciones de vacunas se proporcionan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Osol, A., Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, páginas 1324-1341 (1980), referencia que se incorpora a la presente memoria a modo de referencia).

Las composiciones terapéuticas de la presente invención se pueden administrar parenteralmente mediante inyección, infusión rápida, absorción nasofaríngea (intranasofaríngeamente), dermoabsorción, u oralmente. Las composiciones pueden administrarse de forma alternativa intramuscularmente o intravenosamente. Las composiciones para la administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones esterilizadas acuosas o no acuosas. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilénglicol, polietilénglicol, aceites vegetales tales como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Se pueden usar vehículos o recubrimientos oclusivos para aumentar la permeabilidad de la piel y potenciar la absorción del antígeno. Las formas de dosis líquidas para administración oral pueden comprender generalmente una disolución de liposomas que contiene la forma de dosis líquida. Las formas adecuadas de suspender liposomas incluyen emulsiones, suspensiones, disoluciones, jarabes y elixires que contienen diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tal como agua purificada. Además de los diluyentes inertes, dichas composiciones también pueden incluir adyuvantes, agentes humectantes, agentes emulsificantes y de suspensión, o agentes edulcorantes, aromatizantes o perfumes.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención también se pueden administrar en forma encapsulada. Por ejemplo, la inmunización intranasal de ratones contra la infección de *Bordetella pertussis* usando vacunas encapsuladas en microesferas biodegradables compuestas por poli(DL-lactido-co-glicólido) ha demostrado estimular respuestas inmunes protectoras. Shahin, R. y col., *Infect. Immun. 63*: 1195-1200 (1995). De forma similar, los antígenos de *Salmonella typhimurium* encapsulados administrados oralmente también han demostrado provocar una inmunidad protectora en ratones. Allaoui-Attarki, K. y col., *Infect. Immun*. 65: 853-857 (1997). Las vacunas encapsuladas de la presente invención se pueden administrar mediante una serie de rutas que incluyen las que implican poner en contacto la vacuna con membranas mucosas (por ejemplo, intranasalmente, intracolónicamente, intraduodenalmente).

Existen muchas técnicas diferentes para controlar el tiempo de las inmunizaciones cuando se utiliza un régimen de administración múltiple. Es posible usar las composiciones de la invención más de una vez para incrementar los niveles y la diversidad de la expresión del repertorio de inmunoglobulina expresado por el animal inmunizado. Normalmente, si se producen múltiples inmunizaciones, se administrarán con uno o dos meses de diferencia.

De acuerdo con la presente invención, una "cantidad eficaz" de una composición terapéutica es aquella que es suficiente para lograr un efecto biológico deseado. Generalmente, la dosis necesitada para proporcionar una cantidad eficaz de la composición variará dependiendo de factores tales como la edad, condición, sexo, y extensión de la enfermedad, si la hay, del animal o humano, y de otras variables que pueden ser ajustadas por el especialista en la técnica.

Las preparaciones antigénicas de la invención se pueden administrar en dosis sencillas o múltiples de una cantidad eficaz. Las cantidades eficaces de las composiciones de la invención pueden variar entre 0,01 y 1.000 μg/mL por dosis, más preferiblemente entre 0,1 y 500 μg/mL por dosis, y aún más preferiblemente entre 10 y 300 μg/mL por dosis.

Habiendo descrito ya la invención de forma general, será más fácil comprenderla haciendo referencia a los siguientes Ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden limitar la presente invención, a no ser que se indique lo contrario.

Ejemplos

Ejemplo 1

Expresión y purificación de polipéptidos de S. pneumoniae en E. coli

El vector de expresión bacteriano pQE10 (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) se usa en este Ejemplo para clonar las secuencias de nucleótido mostradas en la Tabla 1, y para expresar los polipéptidos identificados en la Tabla 1. Los componentes del plásmido pQE10 se disponen de tal modo que la secuencia de ADN insertada que codifica un polipéptido de la presente invención exprese el polipéptido con los seis residuos His (es decir, un "marca 6 X His") ligada covalentemente al extremo amino.

Las secuencias de ADN que codifican las porciones deseadas de los polipéptidos de la Tabla 1 se amplifican usando prímeros de oligonucleótido de PCR procedentes de una biblioteca de ADN construida a partir de *S. pneumoniae*, tal como la depositada por los inventores en la ATCC para mayor comodidad, con Nº de Depósito ATCC 97755, o a partir de ADN aislado del mismo organismo, tal como la cepa de *S. pneumoniae* depositada con el Nº de Depósito ATCC 55840. En la Tabla 3 se proporciona una lista de los prímeros de PCR que se pueden usar para este fin. Los prímeros de PCR se combinan con las secuencias de nucleótido que codifican las secuencias de aminoácidos aminoterminal y carboxiterminal de la porción deseada de los polipéptidos de la Tabla 1. Se añadieron nucleótidos adicionales que contienen las posiciones de restricción para facilitar la clonación en el vector pQE10 en las secuencias de prímero 5' y 3', respectivamente. Dichas posiciones de restricción se enumeran en la Tabla 3 para cada prímero. En cada caso, el prímero comprende, empezando en el extremo 5', 4 nucleótidos aleatorios para evitar la "respiración" durante el proceso de envejecimiento, una posición de restricción (mostrada en la Tabla 3), y aproximadamente 15 nucleótidos de la secuencia ORF de *S. pneumoniae* (la secuencia completa de cada prímero de clonación se muestra como SEQ ID NO: 291 y SEQ ID NO: 292).

Para clonar los polipéptidos de la Tabla 1, se seleccionaron los prímeros 5' y 3' para amplificar sus respectivas secuencias codificadoras de nucleótidos. El especialista en la técnica apreciará que el punto de la proteína que codifica la secuencia en el que comienza el prímero 5' puede ser modificado para amplificar un segmento de ADN que codifica cualquier porción deseada de las secuencias de aminoácidos completas descritas en la Tabla 1. De forma similar, el especialista en la técnica también apreciará que el punto de la proteína que codifica la secuencia en el que comienza el prímero 3' también puede modificarse para amplificar un segmento de ADN que codifica cualquier porción deseada de la secuencia completa de aminoácidos descrita en la Tabla 1.

El fragmento de ADN amplificado y el vector pQE10 son digeridos con la(s) enzima(s) de restricción apropiada (s), y a continuación se ligan juntos los ADNs digeridos. La mezcla de ligadura se transforma en células de *E. coli* competentes usando procedimientos estándar tales como los descritos en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer a presión selectiva sobre placas LB. El ADN plásmido se aísla a partir de colonias resistentes y la identidad del ADN clonado se confirma mediante análisis de restricción, PCR y secuenciamiento de ADN.

Los clones que contienen las construcciones deseadas se cultivan durante la noche ("O/N") en cultivo líquido en selección. El cultivo O/N se usa para inocular un gran cultivo, con una dilución de aproximadamente 1:25 a 1:250. Las células se cultivan hasta una densidad óptica a 600 nm ("OD600") de entre 0,4 y 0,6. A continuación se añade isopropil-b-D-tiogalactopiranósido ("IPTG") con una concentración final de 1 mM para inducir la transcripción del promotor sensible represor lac, mediante la desactivación del represor lacl. Posteriormente las células son incubadas otras 3-4 horas. A continuación se recolectan las células mediante centrifugación.

Las células se agitan durante 3-4 horas a 4ºC en guanidina-HCl 6M, pH 8. Los desechos celulares se eliminan mediante centrifugación, y el sobrenadante que contiene la proteína de interés se carga en una columna de resina de afinidad de ácido níquel-nitrilo-triacético ("NiNTA") (disponible en QIAGEN, Inc., ver anterior). Las proteínas con la marca 6x His se unen a la resina NI-NTA con una elevada afinidad y se pueden purificar en un procedimiento sencillo de una sola etapa (para más detalles véase: The QIAexpressionist, 1995, QIAGEN, Inc., ver anterior). En resumen, el sobrenadante se carga en la columna en guanidina-HCl 6 M, pH 8, la columna se lava primero con 10 volúmenes de guanidina-HCl 6 M, pH 8, a continuación se lava con 10 volúmenes de guanidina-HCl 6 M, pH 6, y finalmente se eluye el polipéptido con guanidina-HCl 6 M, pH 5,0.

La proteína purificada se renaturaliza a continuación dializándola frente a disolución salina tamponada con fosfato (PBS) o frente a tampón de acetato de Na 50 mM, pH 6, más NaCl 200 mM. De forma alternativa, la proteína puede ser replegada con éxito mientras se mantiene inmovilizada sobre la columna Ni-NTA. Las condiciones recomendadas son las siguientes: renaturalizar usando un gradiente lineal de urea 6M-1M en NaCl 500 mM, glicerol al 20%, Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, que contiene inhibidores de proteasa. La renaturalización debería llevarse a cabo a lo largo de un periodo de 1,5 horas o más. Después de la renaturalización, las proteínas se pueden eluir mediante la adición de imidazol 250 mM. Se elimina el imidazol mediante una etapa final de dialización frente a PBS o frente a tampón de acetato sódico 50 mM, pH 6, más NaCl 200 mM. La proteína purificada se almacena a 4ºC o se congela a -80ºC.

Las secuencias de ADN que codifican la secuencia de aminoácidos de la Tabla 1 también se pueden clonar y expresar como proteínas de fusión empleando un protocolo similar al descrito antes, en el que se usa preferentemente el vector pET-32b(+) (Novagen, 601 Science Drive, Madison, WI 53711) en lugar del pQE10.

El polinucleótido mostrado en la Tabla 1 fue amplificado y subclonado con éxito en pQE10, tal como se describe anteriormente, usando los prímeros de PCR mostrados en la Tabla 3. Los especialistas en la técnica apreciarán que el aislamiento de un plásmido individual a partir de un depósito de conjunto es trivial, una vez conocida la información y los reactivos descritos en la presente memoria. Cada uno de los clones depositados es capaz de expresar su polipéptido de *S. pneumoniae* codificado.

Ejemplo 2

Inmunización y detección de respuestas inmunes

Métodos

Crecimiento de inóculo bacteriano, inmunización de ratones y exposición a S. pneumoniae

La propagación y el almacenamiento de *S. pneumoniae*, y la exposición al mismo, se realizan esencialmente como se ha descrito en Aaberge, I.S. y col., "Virulence of *Streptococcus pneumoniae* in mice: a standardized method for preparation and frozen storage of the experimental bacterial inoculum", *Microbial Pathogenesis* 18: 141 (1995), incorporada a la presente memoria a modo de referencia.

En resumen, se usa caldo de cultivo de Todd Hewitt (TH) (Difco Laboratories, Detroit, MI) con un 17% de FCS, y placas de agar de sangre equina para cultivar las bacterias. El caldo de cultivo y las placas de sangre son incubados a 37ºC en una atmósfera de CO_2 al 5%. Las placas de sangre son incubadas durante 18 horas. El caldo de cultivo se diluye regularmente en un factor de 10 en caldo TH mantenido a temperatura ambiente, y las suspensiones bacterianas se mantienen a temperatura ambiente hasta la exposición a los ratones.

Para las inmunizaciones activas se inyectan intraperitonealmente (i.p.) ratones C3H/HeJ (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) en la semana 0 con 20 g de proteína estreptococal recombinante, o con disolución salina tamponada con fosfato (PBS), emulsificada con adyuvante de Freund completo (CFA), se les da una inmunización similar en adyuvante de Freund incompleto (IFA) en la semana 4, y se exponen en la semana 6. Para la exposición se diluye *S. pneumoniae* procedente de cultivos de crecimiento exponencial en caldo TH, y los ratones son inyectados subcutáneamente (s.c.) en la base de la cola con 0,1 mL de dichas disoluciones (se usan diluciones en serie para encontrar la dosis infecciosa media). Los estreptococos usados para la exposición son pasados menos de seis veces *in vitro*. Para determinar la infección, se obtienen muestras sanguíneas de la parte distal de la vena femoral lateral en tubos capilares heparinizados. Se diluye en serie una muestra de 25 μL de sangre en un factor de 10 en caldo TH, y 25 μL de sangre diluida y sin diluir se colocan en placas de agar de sangre. Las placas se cultivan durante 18 horas y se contabilizan las colonias.

En la técnica se conocen otros métodos, por ejemplo, véase Langermann, S. y col., *J. Exp. Med.*, 180: 2277 (1994), incorporada a la presente memoria a modo de referencia.

Inmunoensayos

Se usan varios formatos de inmunoensayo para cuantificar los niveles de anticuerpos específicos estreptococales (ELISA e inmunomancha), y para evaluar las propiedades funcionales de dichos anticuerpos (ensayo de inhibición del crecimiento). Los ensayos ELISA y de inmunomancha también se usan para detectar y cuantificar anticuerpos activados en respuesta a una infección estreptococal que reaccionan con antígenos estreptococales específicos. Cuando se activan anticuerpos de determinados antígenos estreptococales por infección, esto se toma como evidencia de que las proteínas estreptococales en cuestión son expresadas *in vivo*. La ausencia de anticuerpos derivados de la infección (seroconversión) tras exposición estreptococal es una evidencia de que la infección se ha evitado o se ha suprimido. El ensayo de inmunomancha también se utiliza para determinar si los anticuerpos activados contra los antígenos estreptococales recombinantes reconocen una proteína de tamaño similar en extractos de estreptococos enteros. Cuando la proteína natural es de tamaño similar, o idéntico, en el ensayo de inmunomancha a la versión recombinante de la misma proteína, esto se toma como una evidencia de que la proteína recombinante es el producto de un clon de longitud completa del gen respectivo.

Ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA)

El ELISA se usa para cuantificar los niveles de anticuerpos reactivos con antígenos de *Streptococcus* activados en respuesta a la inmunización con dichos antígenos estreptococales. Los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos (Immunlon 4, Dynatech, Chantilly, Virginia, o equivalente) se recubren con antígeno incubando 50 1 de 1 g/mL de disolución de antígeno de proteína en un tampón adecuado, normalmente un tampón de carbonato sódico 0,1 M a pH 9,6. Tras decantar el antígeno no unido, se bloquean más posiciones de unión incubando 100 1 de leche desnatada al 3% en tampón de lavado (PBS, Tween 20 al 0,2%, pH 7,4). Tras lavar, se incuban durante 1 hora

diluciones en serie en un factor de 2 duplicadas de suero en PBS, Tween 20 y suero fetal bovino al 1%, se eliminan, se lavan los pocillos tres veces, y se incuban con IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa equina. Tras tres lavados, se detectan los anticuerpos unidos con H_2O_2 y con 2,2'-azino-di-(3-etilbenctiazoina sulfonato) (Schwan, T.G., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:* 2909-2913 (1985)) (ABTS®, Kirkegaard & Perry Labs., Gaithersburg, MD) y se cuantifica la A_{405} con un lector de placas Vmax™ de Molecular Devices, Corp. (Menlo Park, California). Se asigna el título mínimo de 1:100 a un nivel de IgG que es dos veces el nivel de ruido de fondo en sueros procedentes de ratones naive.

Electroforesis de gel de dodecilsulfatosódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) e inmunotinción

Usando un formato de pocillo único, se llevan a ebullición los extractos totales de proteína estreptococal o de antígeno estreptococal recombinante en tampón de muestra SDS/2-ME antes de someterse a electroforesis a través de geles con un 3% de acrilamida, y de geles de resolución con una mayor concentración de acrilamida, normalmente entre el 10 y el 15% de monómero de archilamida. Los geles son electro-coagulados sobre membranas de nitrocelulosa y se evalúan las bandas con diluciones de anticuerpo que se van ensayar para determinar su reactividad frente a antígenos estreptococales específicos, seguido del conjugado secundario apropiado anticuerpo-enzima (peroxidasa equina). Cuando se desea confirmar que la proteína se ha transferido después de la electro-coagulación, las membranas se tiñen con Ponceau S. Las señales de inmunotinción de los anticuerpos unidos se detectan sobre película de rayos X como quimioluminiscencia usando reactivos ECL™ (Amersham Corp., Arlington Heights, Illinois).

Ejemplo 3

Detección de expresión de mARN de Streptococcus

Se lleva a cabo un análisis Northern blot usando los métodos descritos, entre otros, por Sambrook y col, ver referencia anterior, para detectar la expresión de las secuencias de nucleótidos de *S. pneumoniae* de la presente invención en tejidos animales. Se marca una sonda de cADN que contiene una secuencia completa de nucleótidos mostrada en la Tabla 1 con ^{32}P usando el sistema de marcado de ADN rediprime™ (Amersham Life Science), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras el marcado, la sonda se purifica usando una columna CHROMA SPIN-100TM (Clontech Laboratories, Inc.), de acuerdo con el protocolo del fabricante número PT1200-1. La sonda marcada purificada se usa a continuación para detectar la expresión de mARN de *Streptococcus* en una muestra de tejido animal.

Se examinan tejidos animales, tales como sangre o fluido espinal, con la sonda marcada usando la disolución de hibridación ExpressHyb™ (Clontech) de acuerdo con el protocolo del fabricante número PT1190-1. Tras la hibridación y un lavado, se montan las manchas y se exponen a película a -70ºC durante la noche, y las películas se tratan de acuerdo con los procedimientos estándares.

Ha de quedar claro que la invención se puede llevar a la práctica de otro modo distinto al particularmente descrito en la anterior descripción y en los anteriores ejemplos.

Es posible realizar numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención a la vista de la anterior memoria, y, por tanto, también se encuentran dentro del alcance las reivindicaciones anexas.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Nucleótido SP042 (SEQ ID NO:65)

TTGTTCCTATGAACTTGGTCGTCACCAAGCTGGTCAGGTTAAGAAAGAGTCTAATCGAGTTTC
TTATATAGATGGTGATCAGGCTGGTCAAAAGGCAGAAAACTTGACACCAGATGAAGTCAGTAA
GAGGGAGGGGATCAACGCCGAACAAATNGTNATCAAGATTACGGATCAAGGTTATGTGACCTC
TCATGGAGACCATTATCATTACTATAATGGCAAGGTTCCTTATGATGCCATCATCAGTGAAGA
GCTCCTCATGAAAGATCCGAATTATCAGTTGAAGGATTCAGACATTGTCAATGAAATCAAGGG
TGGTTATGTCATTAAGGTAAACGGTAAATACTATGTNTACCTTAAGGATGCAGCTCATGCGGA
TAATATTCGGACAAAAGAAGAGATTAAACGTCAGAAGCAGGAACGCAGTCATAATCATAACTC
AAGAGCAGATAATGCTGTTGCTGCAGCCAGAGCCCAAGGACGTTATACAACGGATGATGGGTA
TATCTTCAATGCATCTGATATCATTGAGGACACGGGTGATGCTTATATCGTTCCTCACGGCGA
CCATTACCATTACATTCCTAAGAATGAGTTATCAGCTAGCGAGTTAGCTGCTGCAGAAGCCTA
TTGGAATGGGAAGCAGGGATCTCGTCCTTCTTCAAGTTCTAGTTATAATGCAAATCCAGCTCA
ACCAAGATTGTCAGAGAACCACAATCTGACTGTCACTCCAACTTATCATCAAAATCAAGCGGA
AAACATTTCAAGCCTTTTACGTGAATTGTATGCTAAACCCTTATCAGAACGCCATGTGGAATC
TGATGGCCTTATTTTCGACCCAGCGCAAATCACAAGTCGAACCGCCAGAGGTGTAGCTGTCCC
TCATGGTAACCATTACCACTTTATCCCTTATGAACAAATGTCTGAATTGGAAAAACGAATTGC
TCGTATTATTCCCCTTCGTTATCGTTCAAACCATTGGGTACCAGATTCAAGACCAGAACAACC
AAGTCCACAATCGACTCCGGAACCTAGTCCAAGTCCGCAACCTGCACCAAATCCTCAACCAGC
TCCAAGCAATCCAATTGATGAGAAATTGGTCAAAGAAGCTGTTCGAAAAGTAGGCGATGGTTA
TGTCTTTGAGGAGAATGGAGTTTCTCGTTATATCCCAGCCAAGGATCTTTCAGCAGAAACAGC
AGCAGGCATTGATAGCAAACTGGCCAAGCAGGAAAGTTTATCTCATAAGCTAGGAGCTAAGAA
AACTGACCTCCCATCTAGTGATCGAGAATTTTACAATAAGGCTTATGACTTACTAGCAAGAAT
TCACCAAGATTTACTTGATAATAAAGGTCGACAAGTTGATTTTGAGGCTTTGGATAACCTGTT
GGAACGACTCAAGGATGTCNCAAGTGATAAAGTCAAGTTAGTGGANGATATTCTTGCCTTCTT
AGCTCCGATTCGTCATCCAGAACGTTTAGGAAAACCAAATGCGCAAATTACCTACACTGATGA
TGAGATTCAAGTAGCCAAGTTGGCAGGCAAGTACACAACAGAAGACGGTTATATCTTTGATCC
TCGTGATATAACCAGTGATGAGGGGGATGCCTATGTAACTCCACATATGACCCATAGCCACTG
GATTAAAAAAGATAGTTTGTCTGAAGCTGAGAGAGCGGCAGCCCAGGCTTATGCTAAAGAGAA
AGGTTTGACCCCTCCTTCGACAGACCATCAGGATTCAGGAAATACTGAGGCAAAAGGAGCAGA
AGCTATCTACAACCGCGTGAAAGCAGCTAAGAAGGTGCCACTTGATCGTATGCCTTACAATCT
TCAATATACTGTAGAAGTCAAAAACGGTAGTTTAATCATACCTCATTATGACCATTACCATAA
CATCAAATTTGAGTGGTTTGACGAAGGCCTTTATGAGGCACCTAAGGGGTATACTCTTGAGGA
TCTTTTGGCGACTGTCAAGTACTATGTCGAACATCCAAACGAACGTCCGCATTCAGATAATGG
TTTTGGTAACGCTAGCGACCATGTTCAAAGAAACAAAAATGGTCAAGCTGATACCAATCAAAC
GGAAAAACCAAGCGAGGAGAAACCTCAGACAGAAAAACCTGAGGAAGAAACCCCTCGAGAAGA
GAAACCGCAAAGCGAGAAACCAGAGTCTCCAAAACCAACAGAGGAACCAGAAGAATCACCAGA
GGAATCAGAAGAACCTCAGGTCGAGACTGAAAAGGTTGAAGAAAAACTGAGAGAGGCTGAAGA
TTTACTTGGAAAAATCCAGGAT

Aminoácido SP042 (SEQ ID NO:66)

CSYELGRHQAGQVKKESNRVSYIDGDQAGQKAENLTPDEVSKREGINAEQXVIKITDQGYVTS
HGDHYHYYNGKVPYDAIISEELLMKDPNYQLKDSDIVNEIKGGYVIKVNGKYYVYLKDAAHAD
NIRTKEEIKRQKQERSHNHNSRADNAVAAARAQGRYTTDDGYIFNASDIIEDTGDAYIVPHGD
HYHYIPKNELSASELAAAEAYWNGKQGSRPSSSSSYNANPAQPRLSENHNLTVTPTYHQNQGE
NISSLLRELYAKPLSERHVESDGLIFDPAQITSRTARGVAVPHGNHYHFIPYEQMSELEKRIA
RIIPLRYRSNHWVPDSRPEQPSPQSTPEPSPSPQPAPNPQPAPSNPIDEKLVKEAVRKVGDGY
VFEENGVSRYIPAKDLSAETAAGIDSKLAKQESLSHKLGAKKTDLPSSDREFYNKAYDLLARI
HQDLLDNKGRQVDFEALDNLLERLKDVXSDKVKLVXDILAFLAPIRHPERLGKPNAQITYTDD
EIQVAKLAGKYTTEDGYIFDPRDITSDEGDAYVTPHMTHSHWIKKDSLSEAERAAAQAYAKEK
GLTPPSTDHQDSGNTEAKGAEAIYNRVKAAKKVPLDRMPYNLQYTVEVKNGSLIIPHYDHYHN
IKFEWFDEGLYEAPKGYTLEDLLATVKYYVEHPNERPHSDNGFGNASDHVQRNKNGQADTNQT
EKPSEEKPQTEKPEEETPREEKPQSEKPESPKPTEEPEESPEESEEPQVETEKVEEKLREAED
LLGKIQD

TABLA 2

SP042

Gly-11 a Arg-19; Ile-23 a Lys-31; His-145 a Asn-151; Gln-159 a Asp-166; Ile-175 a Asp-181; Gly-213 a Tyr-225; Ile-283 a Val-291; Pro-329 a Glu-364; Arg-372 a Ser-386; Thr-421 a Phe-430; Leu-445 a Val-453; Ile-486 a Ala-497; Asp-524 a Ala-535; His-662 a Gly-674; y His-679 a Gln-702.

TABLA 3

SP042A	NO:291	GACTGGATCCTTGTTCCTATGAACTTGGTCGTCACC
	Bam HI	
SP042B	NO:292	CATGAAGCTTATCCTGGATTTTTCCAAGTAAATCT
	Hind III	

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en

(a) polinucleótidos que codifican el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la SEQ ID NO: 66;

(b) polinucleótidos que tienen la secuencia codificadora mostrada en la SEQ ID NO: 65 que codifica el polipéptido;

(c) polinucleótidos que son idénticos en al menos un 95% a la secuencia codificadora mostrada en la SEQ ID NO: 65,

(d) polinucleótidos que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 95% a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 66,

(e) polinucleótidos que codifican una porción portadora de epítopo de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

Gly-11 a Arg-19; Ile-23 a Lys-31; His-145 a Asn-151; Gln-159 a Asp-166; Ile-175 a Asp-181; Gly-213 a Tyr-225; Ile-283 a Val-291; Pro-329 a Glu-364; Arg-372 a Ser-386; Thr-421 a Phe-430; Leu-445 a Val-453; Ile-486 a Ala-497; Asp-524 a Ala-535; His-662 a Gly-674; y His-679 a Gln-702; de la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la SEQ ID NO: 66 y

(f) polinucleótidos que codifican fragmentos que comprenden al menos 50 aminoácidos contiguos de un polipéptido codificado por un polinucleótido de uno cualquiera de los apartados (a) a (d)

o la cadena complementaria de dicho polinucleótido.

2. El polinucleótido de la reivindicación 1, que es ADN.

3. El polinucleótido de la reivindicación 1, que es ARN.

4. Un método de fabricación de un vector recombinante que comprende insertar un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en un vector.

5. Un vector recombinante que contiene el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o producido mediante el método de la reivindicación 4.

6. El vector de la reivindicación 5, en el que el polinucleótido está ligado operativamente a una secuencia de control de expresión que permite la expresión en células hospedantes procarióticas o eucarióticas.

7. Un método para fabricar una célula hospedante recombinante que comprende introducir el vector de la reivindicación 5 ó 6 en una célula hospedante.

8. Una célula hospedante transformada con el vector de la reivindicación 5 ó 6, o producida mediante el método de la reivindicación 7.

9. Un proceso para producir un polipéptido codificado por el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende: cultivar la célula hospedante de la reivindicación 8 y recubrir el polipéptido codificado por dicho polinucleótido del cultivo.

10. Un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o que se puede obtener mediante el proceso de la reivindicación 9.

11. Un antígeno de polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una porción portadora de epítopo de la reivindicación 1 (e) seleccionada del grupo que consiste en: Gly-11 a Arg-19; Ile-23 a Lys-31; His-145 a Asn-151; Gln-159 a Asp-166; Ile-175 a Asp-181; Gly-213 a Tyr-225; Ile-283 a Val-291; Pro-329 a Glu-364; Arg-372 a Ser-386; Thr-421 a Phe-430; Leu-445 a Val-453; Ile-486 a Ala-497; Asp-524 a Ala-535; His-662 a Gly-674; y His-679 a Gln-702, de la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en SEQ ID NO: 66.

12. Una proteína codificada por un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que carece de metionina N-terminal.

13. Una proteína de fusión que comprende el polipéptido de la reivindicación 10, y una secuencia de polipéptido heteróloga.

14. Un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido de la reivindicación 10.

15. Un hibridoma que produce el anticuerpo de la reivindicación 14.

16. Una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el polipéptido de la reivindicación 10 o un ADN que codifica y que es capaz de expresar dicho polipéptido *in vivo* o el anticuerpo de la reivindicación 14, y opcionalmente un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

17. Una composición de diagnóstico que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el anticuerpo de la reivindicación 14.

18. El uso del polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, del polipéptido de la reivindicación 10, o del anticuerpo de la reivindicación 14, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención o la atenuación de una infección provocada por un miembro del género *Streptococcus*.

19. Un proceso diagnóstico que comprende analizar en busca de la presencia del polipéptido de la reivindicación 10 en una muestra derivada de un hospedante.

20. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, que es una vacuna.

21. La vacuna de la reivindicación 20, que comprende:

(a) un polipéptido de *S. pneumoniae* de la reivindicación 10, o un fragmento del mismo; y

(b) un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que está presente dicho polipéptido en una cantidad eficaz para activar anticuerpos protectores en un animal frente a un miembro del género *Streptococcus*.

22. Un método para detectar ácidos nucleicos de *Streptococcus* en una muestra biológica obtenida de un animal, que comprende:

(a) poner en contacto la muestra con una o más sondas de ácido nucleico que comprenden el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en las condiciones en las que se produzca hibridación; y

(b) detectar la hibridación de dichas una o más sondas con las una o más secuencias de ácido nucleico de *Streptococcus* presentes en la muestra biológica.

23. Un método para detectar ácidos nucleicos de *Streptococcus* en una muestra biológica obtenida de un animal, que comprende:

(a) amplificar una o más secuencias de ácido nucleico de *Streptococcus* en dicha muestra usando el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y reacción en cadena de polimerasa; y

(b) detectar dicho ácido nucleico de *Streptococcus* amplificado.

24. Un kit para detectar anticuerpos de *Streptococcus* en una muestra biológica obtenida de un animal, que comprende:

(a) un polipéptido de la reivindicación 10 unido a un soporte sólido; y

(b) un medio de detección.

25. Un método para detectar anticuerpos de *Streptococcus* en una muestra biológica obtenida de un animal, que comprende:

(a) poner en contacto la muestra con un polipéptido de la reivindicación 10, y

(b) detectar complejos anticuerpo-antígeno.