(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 360 296**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/09 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/40 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
C07K 14/315 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06009322 .6**
(96) Fecha de presentación : **09.06.2000**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1731166**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.12.2006**

(54) Título: **Vacunas y proteínas de *Streptococcus pneumoniae*.**

(30) Prioridad: **10.06.1999 US 138453 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI: **02.06.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente: **02.06.2011**

(73) Titular/es: **MEDIMMUNE, L.L.C.**
One Medimmune Way
Gaithersburg, Mariland 20878, US
HUMAN GENOME SCIENCES, Inc.

(72) Inventor/es: **Adamou, John E. y**
Choi, Gil H.

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

ES 2 360 296 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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Vacunas y proteínas de *Streptococcus pneumoniae*

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Streptococcus pneumoniae es una bacteria gram positiva que es un agente principal causante de infecciones invasivas en animales y seres humanos, tales como septicemia, meningitis, otitis media y neumonía lobar (Tuomanen, *et al.* NEJM 322:1280-1284 (1995)). Como parte de un proceso infeccioso, los neumococos se unen fácilmente a las células epiteliales humanas no inflamadas de las vías respiratorias altas y bajas mediante la unión a los hidratos de carbono eucarióticos de manera similar a la lectina (Cundell *et al.*, Micro. Match 17:361-374 (1994)). La conversión en infecciones por neumococos invasivas para bacterias de unión puede implicar la generación local de factores inflamatorios que pueden activar a las células epiteliales para cambiar el número y tipo de receptores en sus superficies (Cundell, *et al.*, Nature, 377:435-438 (1995)). Aparentemente, uno de tales receptores, el factor de activación plaquetaria (FAP) se aplica por la bacteria neumocócica y en un periodo de tiempo muy corto (minutos) a partir de la aparición de FAP, los neumococos muestran adherencia fuertemente aumentada e invasión del tejido. Se ha mostrado que ciertos análogos de receptores solubles evitan la progresión de las infecciones por neumococos (Idanpaan-Heikkila *et al.*, J. Inf. Dis., 176:704-712 (1997)). Se ha sugerido que varias otras proteínas están implicadas en la patogenicidad de *S. pneumoniae* pero solo algunas se han confirmado como factores virulentos. A pesar del hecho de que hay conjugados de cápsula actualmente en ensayo, existe todavía la necesidad de identificar polipéptidos adicionales que tienen epítopos en común de diversas cepas de *S. pneumoniae* con el fin de usar tales polipéptidos como vacunas para proporcionar protección frente a una amplia variedad de serotipos de *S. pneumoniae*.

El documento WO 98/18930 describe antígenos de *Streptococcus pneumoniae* que son candidatos potenciales para la preparación de vacunas.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención dada a conocer en el presente documento se refiere a una vacuna que comprende como ingrediente activo un polipéptido del organismo neumocócico *Streptococcus pneumoniae* que comprende la SEQ ID NO: 6.

Más específicamente, la presente invención da a conocer Sp128 (SEQ ID NO:6) compuesto de 664 residuos de aminoácidos. Se ha encontrado que Sp128 confiere propiedades protectoras en animales inmunizados con dicho polipéptido.

La presente invención se refiere también al campo de los antígenos bacterianos y su uso, por ejemplo, como agentes inmunogénicos en seres humanos y animales para estimular una respuesta inmunitaria. Más específicamente, se refiere a la vacunación de especies de mamíferos con uno o más polipéptidos producidos según la invención descrita en el presenta documento, derivándose tales polipéptidos recombinantes a partir de *Streptococcus pneumoniae*.

Según la presente invención, tales proteínas sirven como un mecanismo para estimular la producción de anticuerpos que protegen al receptor de la vacuna frente a la infección por un intervalo amplio de serotipos capsulares de *S. pneumoniae* patógena.

En un aspecto particular, la presente invención se refiere a la prevención y tratamiento de infecciones por neumococos, tales como infecciones del área del oído medio, nasofaringea, del pulmón y bronquial, sangre, LCR y similares, que están producidas por bacterias neumocócicas.

Además la presente invención se refiere a vacunas preparadas a partir del nuevo polipéptido, descrito en el presente documento. Además, se describen de la misma manera ejemplos del uso de tal polipéptido como una vacuna para la protección de mamíferos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los resultados de 2 experimentos (figuras 1A y 1B, respectivamente), que utilizan la misma preparación de polipéptidos Sp128 y Sp130 (con fines de contextualización). Los resultados demuestran que la inmunización activa con polipéptidos Sp128 o Sp130 recombinantes derivados a partir de un serotipo 4 de Noruega de una cepa de neumococo es capaz de proteger de la muerte a ratones en un modelo de septicemia por neumococos usando la cepa heteróloga SJ2 (serotipo 6B). En estos 2 experimentos, sobrevivieron el 90% y el 100% respectivamente, de los ratones inmunizados con Sp130 al periodo de observación de 14 días tras la exposición con aproximadamente 400 UFC (unidades formadoras de colonias) de neumococos. A la inversa, murieron el 100% de los ratones con inmunización simulada (inyectados solo con PBS (solución salina tamponada con fosfato) más adyuvante) durante el mismo periodo. Además, para ambos experimentos, sobrevivieron el 90% de los ratones inmunizados con Sp128 el mismo periodo de observación de 14 días.

La figura 2 muestra los resultados de la administración pasiva de antisuero de conejo producido frente a Sp130 derivado a partir del serotipo 4 de Noruega. Tal administración pudo de proteger a ratones en el modelo de septicemia por neumococos utilizando una cepa heteróloga. Más específicamente, sobrevivieron el 70% de los ratones inmunizados

con el antisuero de Sp130 al periodo de observación de 10 días tras exposición con 1400 UFC de la cepa WO2 (serotipo 3).

Además, murieron el 100% de los ratones inmunizados con un suero control (recogido antes de la inmunización) en el día 4.

La figura 3 es una inmunotransferencia de tipo western blot que muestra la reactividad de antisuero producido frente a Sp130 recombinante (derivado a partir de la cepa de serotipo 4 de Noruega) con los lisados de célula completa de cepas heterólogas. Todas las cepas de *S. penumoniae* probadas mostraron una banda de peso molecular de aproximadamente 220 kD, la masa esperada para un proteína que contiene tanto la secuencia de Sp128 como la secuencia de Sp130, lo que indica que esta proteína estaba presente en todas las cepas que se probaron. Las cepas probadas incluyeron aislados de cada uno de los serotipos de neumococo representados en el uso actual de la vacuna de polisacárido 23-valente

La figura 4 es una inmunotransferencia de tipo de western blot que muestra la reactividad del suero del paciente o bien con Sp128 o bien con Sp130. La figura 4A muestra los resultados para Sp128. La figura 4B muestra los resultados para Sp130. Se determinaron las proteínas recombinantes mediante SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. Se recogieron los sueros de 5 pacientes (indicados por número en la parte superior) en dos momentos diferentes. La primera recogida (denominada “A” por “suero agudo”) fue poco después de la aparición de la enfermedad; la segunda recogida (denominada “C” por “convaleciente”) se realizó de 8 a 30 días más tarde. Se utilizaron estos sueros para sondear las inmunotransferencias. Los resultados muestran que para los pacientes 2, 3 y 5, el suero convaleciente reaccionó de manera más fuerte con Sp128 y Sp130 de lo que lo hizo el correspondiente de suero agudo. Tales hallazgos constituyen una evidencia indirecta de que tanto Sp128 como Sp130 se expresan por *S. pneumoniae* durante esta fase de infección.

SUMARIO DETALLADO DE LA INVENCIÓN

Según la presente invención en el presente documento se describe un polipéptido recombinantes correspondiente a Sp128 (SEQ ID NO: 6).

Es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos de uso de este polipéptido recombinante, como un medio de inmunización de animales, especialmente mamíferos, lo más especialmente seres humanos, frente a una variedad de infecciones microbianas, especialmente infecciones por neumococo.

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un polipéptido, tal como se describe en el presente documento, tanto si se derivan de fuentes naturales como si se preparan por medio de tecnología recombinante, para el uso en la inmunización de animales, especialmente mamíferos, loa más especialmente seres humanos, frente infección por neumococo.

Es todavía un objeto adicional de la presente invención proporcionar vacunas que incluyen el polipéptido obtenidos a partir de *S. Pneumoniae,* que incluyen el polipéptido preparado mediante medios recombinantes (es decir, proteínas y polipéptidos recombinantes).

El polipéptido de las vacunas descritas como productos de expresión según la invención puede estar en “forma enriquecida”. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “enriquecida” significa que la concentración del material es de al menos aproximadamente 2, 5, 10, 100, ó 1000 veces su concentración natural (por ejemplo), de manera ventajosa el 0,01% en peso, preferiblemente al menos aproximadamente el 0,1% en peso. Se contemplan también las preparaciones enriquecidas de aproximadamente el 0,5%, el 1%, el 5%, el 10%, y el 20% en peso.

“Aislada” significa en el contexto de la presente invención con respecto a los polipéptidos que el material se elimina de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce en la naturaleza). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que se produce en la naturaleza presente en un organismo vivo no está aislado, sino que el mismo polipéptido, separado de algunos o de todos los materiales que co-existen en el sistema natural, está aislado. Tales polipéptidos pueden ser parte de una composición, y todavía estar aislado en el sentido en que tal composición no es parte de su entorno natural. Se proporcionan de manera preferible los polipéptidos de las vacunas descritas en el presente documento en una forma aislada, y preferiblemente se purifican hasta homogeneidad.

Los polipéptidos inmunogénicos o recombinantes descritos según la presente invención también pueden estar en forma “purificada”. El término “purificada” no requiere pureza absoluta; en vez de eso, se propone como una definición relativa, y pueden incluir preparaciones que están altamente purificadas o preparaciones que están solo parcialmente purificadas, tal como se entienden aquellos términos por los expertos en la técnica relevante. Por ejemplo, clones individuales aislados de una biblioteca de ADNc se han purificado de manera convencional hasta homogeneidad electroforética. Se contempla de manera expresa la purificación del material de partida o el material natural hasta al menos un grado de magnitud, preferiblemente dos o tres grados, y más preferiblemente cuatro o cinco grados de magnitud. Además, se contempla de manera expresa el polipéptido reivindicado que tiene una pureza de preferiblemente el 0,001%, o de al menos el 0,01% o el 0,1%; e incluso deseablemente del 1% en peso o superior.

En el nivel más simple, puede sintetizarse la secuencia de aminoácidos correspondiente a todo o parte del polipéptido según la presente invención utilizando sintetizadores de péptidos disponibles comercialmente.

Las vacunas de polipéptidos de la presente invención pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales o polipéptidos sintéticos, preferiblemente polipéptidos recombinantes.

"Recombinante", tal como se utiliza en el presente documento, significa que una proteína se deriva de sistemas de expresión recombinantes (por ejemplo, microbiano o mamífero). "Microbiano" se refiere a proteínas recombinantes preparadas en sistemas de expresión bacterianos o fúngicos (por ejemplo, levadura). Como un producto, "microbiano recombinante" define una proteína esencialmente libre de sustancias endógenas nativas y no acompañadas por glicosilación nativa asociada. La proteína expresada en la mayoría de los cultivos de bacterias, por ejemplo, *E. coli*, estará libre de modificaciones de glicosilación que normalmente podría tener lugar en sistemas de expresión de levaduras o mamíferos. Por tanto, los patrones de tales modificaciones tras la traducción diferirán con el sistema de expresión. Sin embargo, se considera que todas las variantes de este tipo están en la descripción de la presenta invención.

También se describe un anticuerpo aislado que se une de manera específica a un polipéptido de la invención. Un anticuerpo de este tipo puede ser un anticuerpo monoclonal, producido posiblemente por una línea celular de hibridoma, y que puede incluir también un anticuerpo producido de manera recombinante formado mediante la introducción en una línea celular adecuada de las secuencias genéticas requeridas para producir un anticuerpo específico para las vacunas de polipéptidos descritas en el presente documento.

La presente invención también se refiere a una vacuna que comprende polipéptido de *S. Pneumoniae,* descrito en el presente documento, suspendido en un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, siempre que dicho polipéptido esté presente en una cantidad eficaz para obtener anticuerpos protectores en un animal frente a un organismo relacionado con el género *Streptococcus,* preferiblemente un organismo del género *Streptococcus*, y los más preferiblemente cuando el organismo es *Streptococcus pneumoniae*.

Una vacuna descrita según la presente invención puede incluir también una vacuna que comprende un organismo microbiano transformado con polinucleótidos, y por tanto que expresa el polipéptido de Sp128 (SEQ ID NO:6). El microorganismo transformado se selecciona del grupo que consiste en salmonela, micobacteria, estreptococos, virus de la viruela, y adenovirus.

Pueden emplearse fragmentos o partes de los polipéptidos de la presente invención para producir el correspondiente polipéptido de longitud completa mediante la síntesis de péptidos; por tanto, pueden utilizarse los fragmentos como compuestos intermedios para producir los polipéptidos de longitud completa.

Tal como se observa, pueden usarse los polipéptidos, o células que los expresan, tal como un inmunógeno para producir anticuerpos frente a los mismos. Estos anticuerpos pueden ser por ejemplo, policlonales, monoclonales, quiméricos, de cadena sencilla, fragmentos Fab, o el producto de una biblioteca de expresión Fab. Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales, especialmente si estos están en la forma de antisuero producido frente a los polipéptidos, o fragmentos de los mismos, según la presente invención. Tales antisueros encuentran uso en la inmunización frente a la infección por neumococo.

Pueden obtenerse los anticuerpos generados frente a una vacuna de polipéptidos correspondiente a la secuencia de la presente invención mediante inyección directa del polipéptido en el animal o mediante la administración del polipéptido al animal, preferiblemente no un ser humano. El anticuerpo así obtenido, se unirá entonces al propio polipéptido. De esta manera, puede usarse incluso una secuencia que codifica solo para un fragmento del polipéptido para generar anticuerpos que se unen al polipéptido nativo completo.

Para la preparación de los anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos de líneas celulares continuas. Ejemplos incluyen la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, Nature, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor *et al.*, 1983, Inmunology Today 4:72), y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole, *et al.*, 1985, en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96).

Por tanto, la presente invención también se refiere al uso de polipéptidos novedosos descritos en el presente documento, para la producción de linfocitos, o células de hibridoma, que producen anticuerpos monoclonales frente a tales polipéptidos, para prevenir o atenuar una infección causada por un miembro del género streptococcus en un animal.

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de los EE.UU. 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla frente a productos de polipéptido inmunogénicos de esta invención.

Una vacuna según la presente invención incluye el polipéptido descrito anteriormente en el presente documento. Cuando se emplea más de un polipéptido, tal como dos o más polipéptidos pueden utilizarse como una mezcla física o como una fusión de dos o más polipéptidos. El fragmento de fusión o el polipéptido de fusión pueden producirse, por

ejemplo, mediante técnicas recombinantes o mediante el uso de ligadores apropiados para fusionar los polipéptidos o fragmentos activos preparados previamente.

En otro aspecto, la invención se refiere a vacunas de inmunidad pasivas formuladas a partir de anticuerpos frente a un polipéptido de la presente invención. Tales vacunas de inmunidad pasivas pueden utilizarse para prevenir y/o tratar las infecciones por streptococos en pacientes. De esta manera, según un aspecto adicional de la invención, puede producirse una vacuna a partir de un polipéptido sintético o recombinante de la presente invención o un anticuerpo frente a tal polipéptido.

Tal como ya se describió, otro aspecto de la presente invención se refiere a uno o más anticuerpos (monoclonales, policlonales o sueros) frente al polipéptido de la invención tal como se describió anteriormente para la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades que están producidas por la bacteria streptocócica. En particular, la invención se refiere a la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades infecciosas que están producidas por *S. pneumoniae*. Todavía en un aspecto adicional preferido, la invención se refiere a la profilaxis y/o el tratamiento de otitis media, infecciones nasofaríngeas y bronquiales, y similares en seres humanos usando una vacuna de la presente invención.

Generalmente, las vacunas se preparan como productos inyectables, en la forma de suspensiones o disoluciones acuosas. También se conocen bien vacunas en una base de aceite, tales como para su inhalación. Las formas sólidas que se disuelven o suspenden antes de su uso también pueden formularse. Se añaden generalmente excipientes, diluyentes y vehículos farmacéuticos que son compatibles con los principios activos y aceptables para el uso farmacéutico. Ejemplos de tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, dextrosa o glicerol. También pueden utilizarse combinaciones de vehículos.

Las composiciones de vacuna pueden incorporar además sustancias adicionales para estabilizar el pH, o para funcionar como adyuvantes, agentes humectantes, o agentes emulsionantes, que pueden servir para mejorar la eficacia de la vacuna.

Las vacunas generalmente se formulan para su administración parenteral y se inyectan o bien por vía subcutánea o bien por vía intramuscular. Las vacunas de este tipo pueden formularse también como supositorios o para su administración oral, utilizando métodos conocidos en la técnica, o para su administración a través de las vías nasal o respiratoria.

La cantidad de vacuna suficiente para conferir inmunidad frente a bacterias patógenas se determina mediante métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Esta cantidad se determinará basándose en las características del receptor de la vacuna y el nivel de inmunidad requerido. Normalmente, la cantidad de vacuna que va a administrarse se determinará basándose en el criterio de un médico experto. Cuando se administren las vacunas mediante una inyección subcutánea o intramuscular, puede administrarse un intervalo de 5 a 500 μg de proteína purificada.

La presente invención también se refiere a una vacuna en la que se suministra o administra un polipéptido de la presente invención en la forma de un polinucleótido que codifica para el polipéptido o fragmento activo, mediante lo cual se produce el polipéptido o fragmento activo *in vivo*. Puede incluirse el polinucleótido en un vector de expresión adecuado y combinarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Además, los polipéptidos de la presente invención pueden utilizarse como inmunógenos para estimular la producción de anticuerpos para su uso en inmunoterapia pasiva.

Los polipéptidos de la invención pueden producirse sintéticamente mediante sintetizadores de péptido convencionales.

Las proteínas maduras pueden expresarse en células mamíferas, levaduras, bacterias, u otras células bajo el control de promotores apropiados. Los sistemas de traducción libres de células pueden emplearse también para producir tales proteínas utilizando ARN derivados de los constructos de ADN de la presente invención. Los vectores de clonación y expresión adecuados para su uso con huéspedes procariotas y eucariotas se describen por Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989).

La transcripción del ADN que codifica para los polipéptidos de la presente invención por parte de eucariotas superiores se aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector. Son potenciadores los elementos de ADN que actúan en cis, normalmente de manera aproximada desde 10 hasta 300 pb que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en la parte tardía del origen de replicación de 100 a 270 pb, un potenciador de promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador de polioma en la parte tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus.

Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula huésped, por ejemplo el gen de resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen sumamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural en el sentido de 3'. Tales promotores pueden derivarse de operones que codifican para enzimas glicolíticas tales como 3-fosfoglicerato cinasa (PGK); factor α, fosfatasa ácida, o proteínas de choque térmico, entre otras. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en una fase apropiada con secuencias de iniciación y terminación de la traducción. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar para una proteína de fusión que

incluye un péptido de identificación N-terminal que confiere las características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinantes expresado.

Los vectores de expresión útiles para su uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica para una proteína deseada junto con señales de iniciación y terminación de la traducción adecuadas en una fase de lectura que puede funcionar con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores seleccionables fenotípicos y un origen de replicación para garantizar el mantenimiento del vector y para, si se desea, proporcionar la amplificación dentro del huésped. Huéspedes procariotas adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, aunque pueden emplearse también otros por elección, incluyendo especies de estreptococos, especialmente *S. pneumoniae*.

Según la inevnción, pueden utilizarse los propios organismos microbianos transformados genéticamente con polinucleótidos que expresan Sp128, como vehículos de administración de vacunas vivos. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan de ninguna manera a, especies de salmonela, especies de micobacterias, especies de estreptococos, virus de la viruela, adenovirus, y similares. Además, las plantas transgénicas comestibles también pueden ser candidatos para la administración de vacunas.

Como un ejemplo representativo pero no limitante, los vectores de expresión útiles para su uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y un origen bacteriano de replicación derivado de plásmidos disponibles comercialmente que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EE.UU.) y pGEM1 (Promega, Madison, WI, EE.UU.). Estas secciones “de esqueleto” de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural que va a expresarse.

Tras la transformación de una cepa huésped adecuada y el crecimiento de la cepa huésped hasta una densidad de células apropiada, se induce el promotor seleccionado mediante medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y se cultivan las células durante un periodo adicional.

Las células se recogen normalmente mediante centrifugación, se rompen mediante medios físicos o químicos, y se retiene el extracto bruto resultante para una purificación adicional.

Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden romperse mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclo de congelación-descongelación, sonicación, una prensa francesa, rotura mecánica, o el uso de agentes de lisis celular, los métodos de este tipo son muy conocidos para aquellos expertos en la técnica. Sin embargo, se prefieren células huésped que secretan el polipéptido de la invención y permiten la recuperación del polipéptido de los medios de cultivo.

También pueden emplearse diversos sistemas de cultivo de células mamíferas para expresar la proteína recombinante. Ejemplos de sistemas de expresión mamíferos incluyen las líneas de COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritas por Gluzman, Cell, 23:175 (1981), y otras líneas celulares que pueden expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados, y también cualquier sitio de unión a ribosoma necesario, sitio de poliadenilación, sitios aceptores y donadores de corte y empalme, secuencias de terminación transcripcional, y secuencias no transcritas flanqueantes en 5’. Las secuencias de ADN derivadas del corte y empalme SV40, y los sitios de poliadenilación pueden utilizarse para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

Los polipéptidos pueden recuperarse y/o purificarse a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos de recuperación y purificación de proteínas bien conocidos. La metodología de este tipo puede incluir precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía sobre lectina. Pueden utilizarse etapas de repliegue de proteínas, según sea necesario, para completar la configuración de la proteína madura. Con respecto a esto, pueden usarse chaperonas en un procedimiento de plegado de este tipo. Finalmente, puede emplearse una cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para las etapas de purificación final.

Los polipéptidos que son útiles como inmunógenos en la presente invención pueden ser un producto purificado de manera natural, o un producto de procedimientos sintéticos químicos, o producido mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped procariota o eucariota (por ejemplo, mediante células bacterianas, de levaduras, de plantas superiores, de insecto y de mamífero en cultivo). Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilados o no glicosilados.

Los procedimientos para el aislamiento de los polipéptidos expresados individualmente pueden aislarse mediante métodos de expresión recombinante / aislamiento que son muy conocidos en la técnica. Ejemplos típicos para tal aislamiento pueden utilizar un anticuerpo frente a un área conservada de la proteína o frente a una etiqueta His o cola o líder que puede escindirse que se expresa como parte de la estructura de la proteína.

Ahora se describirán adicionalmente realizaciones específicas de la invención con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLO 1

Protección activa con anti-Sp128 y anti-Sp130 (con fines de referencia)

A. Clonación, expresión y purificación de Sp128 y Sp130.

Se aisló el ADN genómico utilizado como diana para la amplificación utilizando la reacción en cadena de la polimerasa de *Streptococcus pneumoniae* (cepa Noruega – serotipo 4), se utilizó la misma cepa para la secuenciación genómica. Se proporcionan la secuencia de nucleótidos de los fragmentos de gen que codifican para Sp128 (SEQ ID NO: 5) y Sp130 (SEQ ID NO: 7) con la secuencia de aminoácidos correspondiente para los polipéptidos Sp128 (SEQ ID NO: 6) y Sp130 (SEQ ID NO: 8) en la lista de secuencias.

Se diseñaron cebadores (SEQ ID NO: 1 – 4) de modo que se amplificaran los fragmentos de gen o bien Sp128 o bien Sp130 y se permitiera su clonación en el vector de expresión de *E. coli* pQE10 con, por ejemplo, la expresión posterior de un producto de proteína marcado con histidina para la purificación mediante cromatografía de afinidad con níquel.

Por tanto, la clonación de los fragmentos amplificados mediante los cebadores de las SEQ ID NOS: 1 y 2 da como resultado el polipéptido de la SEQ ID NO: 6 (denominado Sp128), mientras que la clonación del fragmento amplificado utilizando los cebadores descritos en las SEQ ID NOS: 3 y 4 da como resultado el polipéptido de la SEQ ID NO: 8 (denominado Sp130).

B. La vacunación con Sp128 y Sp130 da como resultado la protección frente a la exposición letal a *S. pneumoniae*

En cada uno de los experimentos mostrados en la figura 1, se inmunizaron ratones C3H/HeJ (10 por grupo) por vía intraperitoneal (i.p.) con proteína o bien Sp128 o bien Sp130 (15 μg en 50 μl de PBS (phosphate buffered saline /solución salina tamponada con fosfato) emulsionada en 50 μl de adyuvante completo de Freund (ACF)). Se inmunizó de manera simulada un grupo de 10 ratones sólo con PBS y ACF.

Se administró una segunda inmunización de 15 μg de proteína con adyuvante incompleto de Freund (AIF) 3 semanas más tarde (recibiendo el grupo inmunizado de manera simulada PBS y AIF).

Se extrajo sangre (sangrado retroorbital) en la semana 7. Se combinó suero de cada grupo para el análisis de anticuerpo anti-Sp128 y anti-Sp130 mediante ELISA. Se expusieron los ratones en la semana 8 mediante la inyección intraperitoneal de aproximadamente 400 UFC (unidades formadoras de colonias) de la cepa SJ2 de *S. pneumoniae* (serotipo capsular 6B). Se determinó en los experimentos preliminares, que la dosis de infección media (DL_{50}) de esta cepa era de aproximadamente 10 UFC. Se monitorizaron los ratones durante 14 días de supervivencia.

Ambos experimentos mostrados en la figura 1 utilizaron las mismas preparaciones de Sp128 y Sp130 recombinantes.

En el experimento mostrado en la figura 1A, el suero de 7 semanas recogido de los 10 ratones inmunizados con o bien Sp128 o bien Sp130 tenían cada uno un título de ELISA final de 1:2.048.000 y 1:1.024.000, respectivamente. No se detectó ningún anticuerpo anti-Sp128 ni anti-Sp130 en los sueros de los ratones inmunizados de manera simulada. El noventa por ciento de los ratones inmunizados con proteína o bien Sp128 o bien Sp130 sobrevivieron a la exposición (406 UFC de neumococos) durante la duración del estudio (14 días). El cien por cien de los ratones inmunizados de manera simulada estaban muertos en el día 7.

En el experimento mostrado en la figura 1B, los sueros de 7 semanas recogidos de los 10 ratones inmunizados con o bien Sp128 o bien Sp130 cada uno tenían un título de ELISA final de 1:1.024.000 y 1:512.000, respectivamente. No se detectó ningún anticuerpo anti-Sp128 ni anti-Sp130 en los sueros de los ratones inmunizados de manera simulada. El noventa y uno por ciento de los ratones inmunizados con proteína o bien Sp128 o bien Sp130, respectivamente, sobrevivió a la exposición (404 UFC de neumococos) durante la duración del estudio (14 días). El cien por cien de los ratones inmunizados de manera simulada estaban muertos en el día 5.

Estos datos indican que la inmunización de los ratones con proteínas recombinantes o bien Sp128 o bien Sp130 provoca una respuesta que puede proteger frente a la infección sistémica por neumococos y la muerte posterior. Se demuestra la protección cruzada mediante el hecho de que la proteína recombinante de neumococo se generaba partiendo de la base de una secuencia de ADN de serotipo capsular 4, mientras que la exposición era con la cepa heteróloga SJ2 (serotipo capsular 6B).

EJEMPLO 2

Protección pasiva con antisueros anti-Sp130

A. Generación de suero inmunitario de conejo

Tras la recogida de suero preinmunitario, se inmunizó un conejo blanco de Nueva Zelanda con 250 μg de Sp130 (SEQ ID NO: 8) en adyuvante completo de Freund. Se le administraron al conejo 2 inmunizaciones de refuerzo de 125 μg de Sp130 en adyuvante incompleto de Freund en los días 21 y 52, y se sangraron en los días 31 y 62.

B. Protección pasiva en ratones

Se inmunizaron de manera pasiva ratones BALB/cByJ (10 por grupo) mediante 2 inyecciones i.p. de 100 μl de suero de conejo. Se administró la primera inyección 24 horas antes de la exposición con 1.400 UFC de la cepa WU2 de *S. pneumoniae*, y se administró la segunda inyección 4 horas tras la exposición. La figura 2 muestra la supervivencia de los ratones tras la infección con la cepa WU2 (serotipo capsular 3). En experimentos preliminares, se determinó que la DL_{50} de esta cepa era de aproximadamente 100 UFC.

La figura 2 muestra la supervivencia de los ratones inyectados con 1.400 UFC de la cepa WU2. Tal como se muestra en la misma, el 70% de los ratones inmunizados con suero inmunitario de conejo producido frente a la proteína Sp130 sobrevivieron al periodo de observación de 10 días. De los ratones inmunizados con el suero control (recogido de un conejo antes de la inmunización), el 100% murió en el día 4.

Estos datos sugieren que la protección frente a la infección por neumococos que resulta de la inmunización con Sp130 está mediada por anticuerpos, ya que se protegieron los ratones mediante la transferencia pasiva de suero desde un conejo hiperinmunizado. Tal como se observó en los experimentos de exposición activa de ratones descritos previamente, el suero dirigido contra la proteína recombinante Sp130 clonado a partir de una cepa de serotipo 4 era protector frente a la exposición con una cepa heteróloga, WU2 (serotipo capsular 3).

EJEMPLO 3

Conservación de Sp128-Sp130 entre las cepas de *S. pneumoniae*

A. Inmunotransferencia de tipo western blot

Se obtuvieron las cepas de neumococo utilizadas en este experimento a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD) e incluyen un aislado de cada uno de los serotipos en la vacuna antineumocócica multivalente utilizada actualmente.

Para todos los lisados celulares, se hicieron crecer neumococos hasta la fase semilogarítmica (la absorbancia a 620 nm era de 0,4 a 0,6) en 2 ml de caldo de Todd-Hewitt con un extracto de levadura al 5% (de Difco, Detroit, MI) a 37ºC. Se recogieron las bacterias mediante centrifugación y se lavaron dos veces con agua. Se resuspendieron los sedimentos (que consistían en células sedimentadas) en 200 μl de tampón de lisis (dodecilsulfato de sodio al 0,01%, citrato de sodio 0,15 M, y desoxicolato de sodio al 0,1%) y se incubaron a 37ºC durante 30 min, después se diluyeron en un volumen igual de 2X SSC (NaCl 0,3 M, citrato de sodio 0,03 M). Se determinaron los polipéptidos en los lisados en SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y se sometieron a estudios con sonda con anticuerpo mediante procedimientos de inmunotransferencia de tipo western blot convencionales. Se utilizaron sueros de un conejo blanco de Nueva Zelanda inmunizado con Sp130 (tal como para el ejemplo 2, anteriormente) con una dilución de 1:3.000. Se detectó anticuerpo fijado con IgG anti-conejo de oveja conjugada con peroxidasa utilizando un kit de quimioluminiscencia de Amersham Inc. (Cambridge, MA).

Los sueros anti-Sp130 de conejo revelaron 2 bandas principales con pesos moleculares aparentes de 110 kD y 220 kD en los 23 lisados de neumococos sometidos a prueba (tal como se muestra en la figura 3).

Estos datos muestran que el Sp130 se expresa y comparte epítopos antígenos comunes con las cepas de los 23 serotipos capsulares de neumococos representadas en la vacuna de polisacáridos utilizada actualmente.

EJEMPLO 4

Inmunogenicidad de Sp128 y Sp130 en seres humanos

Se utilizaron sueros de pacientes con bacteriemia neumocócica comprobada mediante cultivo, en inmunotransferencias de tipo western blot que contenían proteína recombinante Sp128 o Sp130. En el experimento mostrado en la figura 4, se diluyeron sueros de 5 pacientes (indicados mediante los números 1 a 5) a 1:3.000 y se utilizaron para someter a estudios de inmunotransferencia con sonda que contenían Sp128 (SEQ ID NO: 6) o Sp130 (SEQ ID NO: 8).

Se sometieron a estudios con sonda los carriles etiquetados con “A” (para “agudo”) con suero recogido poco después del diagnóstico de infección por neumococos; los carriles denominados “C” (para “convaleciente”) se sometieron a estudios con sonda con suero recogido o bien 1 mes más tarde (pacientes 1, 2 y 3) o bien 8 días tras la primera recogida de suero (pacientes 4 y 5). Para los pacientes 2, 3 y 5, la reactividad del suero convaleciente con Sp128 y Sp130 era más fuerte que la del suero agudo correspondiente.

Otros experimentos (no representados en la figura) mostraron que los sueros convalecientes de 17 pacientes con infecciones por neumococos se sometieron a prueba individualmente para determinar la reactividad con o bien Sp128 o bien Sp130. Así, se encontró que 10 y 15 de los 23 sueros se fijaban (en una inmunotransferencia de tipo western blot) a Sp128 y Sp130, respectivamente.

Estos experimentos indican que Sp128 y Sp130 (el último en una mayor medida), son reconocidos por el sistema inmunitario humano y sugieren que pueden producirse anticuerpos que pueden fijar la proteína Sp128-Sp130 durante la infección natural por *S. pneumoniae* en seres humanos. Además, esto proporciona una evidencia indirecta de que se expresan Sp128 y Sp130 *in vivo* por *S. pneumoniae* durante esta fase de la infección, y por tanto pueden estar disponibles como dianas para inmunoprofilaxis, inmunoterapia, o para proporcionar respuestas inmunitarias anamnésticas en sujetos vacunados con estas proteínas. Puesto que se infectaron los pacientes con una variedad de cepas de neumococos, estos datos también apoyan la idea de que Sp130 se conserva más antigénicamente que Sp128.

Sentencia 1. Una vacuna que comprende un polipéptido, incluyendo fragmentos inmunogénicos del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 65% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Sentencia 2. La vacuna de la sentencia 1, en la que dicha secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos el 80% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Sentencia 3. La vacuna de la sentencia 1, en la que dicha secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos el 95% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Sentencia 4. La vacuna de la sentencia 1, en la que dicha secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Sentencia 5. Una vacuna que comprende un polipéptido, incluyendo fragmentos inmunogénicos del mismo, que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 65% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

Sentencia 6. La vacuna de la sentencia 5, en la que dicha secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos el 80% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

Sentencia 7. La vacuna de la sentencia 5, en la que dicha secuencia de aminoácidos es idéntica en al menos el 95% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

Sentencia 8. La vacuna de la sentencia 5, en la que dicha secuencia de aminoácidos es idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

Sentencia 9. Un antisuero producido por inmunización de un animal con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos de las sentencias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

Sentencia 10. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos según las sentencias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

Sentencia 11. El anticuerpo de la sentencia 10, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

Sentencia 12. Una célula obtenida por ingeniería genética que produce un anticuerpo monoclonal de la sentencia 11.

Sentencia 13. Un antisuero producido por inmunización de un animal con el polipéptido de SEQ ID NO:6.

Sentencia 14. Un antisuero producido por inmunización de un animal con el polipéptido de SEQ ID NO:8.

Sentencia 15. Un anticuerpo recombinante aislado que se une específicamente a un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos de las sentencias 1, 2, 3,4, 5, 6, 7 y 8.

Sentencia 16. Una vacuna que comprende:

a. uno o más polipéptidos de *S. pneumoniae* seleccionados del grupo que consiste en los polipéptidos de las sentencias 1, 2, 3,4, 5, 6, 7 y 8; y

b. un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable;

en el que dicho polipéptido está presente en una cantidad eficaz para obtener anticuerpos protectores en un animal frente a un organismo del género *Streptococcus*.

Sentencia 17. Un método para prevenir o atenuar una infección producida por un miembro del género *Streptococcus* en un animal, que comprende administrar a dicho animal un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos de las sentencias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, y en el que dicho polipéptido se administra en una cantidad eficaz para prevenir o atenuar dicha infección.

Sentencia 18. Un método para prevenir una infección por neumococos mediante administración a un animal de la vacuna según la reivindicación 16.

Sentencia 19. Un método para prevenir o atenuar una infección producida por un miembro del género *Streptococcus* en un animal, que comprende administrar a dicho animal un anticuerpo según la sentencia 10, en el que dicho anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para prevenir o atenuar dicha infección.

Sentencia 20. Una vacuna que comprende un organismo microbiano transformado con polinucleótidos, y que expresan de ese modo los polipéptidos, o fragmentos del mismo, seleccionados del grupo que consiste en Sp128 y Sp130.

Sentencia 21. Un método para prevenir o atenuar una infección producida por un miembro del género *Streptococcus* en un animal, que comprende administrar a dicho animal una vacuna según la sentencia 20, en el que dicho anticuerpo se administra en una cantidad eficaz para prevenir o atenuar dicha infección.

Sentencia 22. La vacuna según la sentencia 20, en la que dicho microorganismo transformado se selecciona del grupo que consiste en salmonela, micobacteria, estreptococo, virus de la viruela, y adenovirus.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Adamou, John

Choi, Gil

<120> Vacunas y proteínas de *Streptococcus pneumoniae*

<130> 469201-475

<140>

<141>

<150> U.S. 60/138.453

<151> 1999-06-10

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador directo para la amplificación por PCR de secuencias genómicas de Sp128

<400> 1

tacccggtag tcttagcaga c **21**

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador inverso para la amplificación por PCR de secuencias genómicas de Sp128

<400> 2

atagccataa gttgatttgc catta **25**

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador directo para la amplificación por PCR de secuencias genómicas de Sp130

<400> 3

aagcttggcg agattgcaga a 21

<210> 4

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: cebador inverso para la amplificación por PCR de secuencias genómicas de Sp130

<400> 4

cttattagga ttgttagtag ttgattt 27

<210> 5

<211> 1992

<212> ADN

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 5

```
tacccggtag tcttagcaga cacatctagc tctgaagatg ctttaaacat ctctgataaa 60
gaaaaagtag cagaaaataa agagaaacat gaaaatatcc atagtgctat ggaaacttca 120
caggatttta aagagaagaa aacagcagtc attaaggaaa aagaagttgt tagtaaaaat 180
cctgtgatag acaataacac tagcaatgaa gaagcaaaaa tcaaagaaga aaattccaat 240
aaatcccaag gagattatac ggactcattt gtgaataaaa acacagaaaa tcccaaaaaa 300
gaagataaag ttgtctatat tgctgaattt aaagataaag aatctggaga aaaagcaatc 360
aaggaactat ccagtcttaa gaatacaaaa gttttatata cttatgatag aatttttaac 420
ggtagtgcca tagaaacaac tccagataac ttggacaaaa ttaaacaaat agaaggtatt 480
tcatcggttg aaagggcaca aaaagtccaa cccatgatga atcatgccag aaaggaaatt 540
ggagttgagg aagctattga ttacctaaag tctatcaatg ctccgtttgg gaaaaatttt 600
gatggtagag gtatggtcat ttcaaatatc gatactggaa cagattatag acataaggct 660
atgagaatcg atgatgatgc caaagcctca atgagattta aaaaagaaga cttaaaaggc 720
actgataaaa attattggtt gagtgataaa atccctcatg cgttcaatta ttataatggt 780
ggcaaaatca ctgtagaaaa atatgatgat ggaagggatt attttgaccc acatgggatg 840
catattgcag ggattcttgc tggaaatgat actgaacaag acatcaaaaa ctttaacggc 900
atagatggaa ttgcacctaa tgcacaaatt ttctcttaca aaatgtattc tgacgcagga 960
tctgggtttg cgggtgatga aacaatgttt catgctattg aagattctat caaacacaac 1020
gttgatgttg tttcggtatc atctggtttt acaggaacag gtcttgtagg tgagaaatat 1080
tggcaagcta ttcgggcatt aagaaaagca ggcattccaa tggttgtcgc tacgggtaac 1140
```

```
tatgcgactt ctgcttcaag ttcttcatgg gatttagtag caaataatca tctgaaaatg 1200
accgacactg gaaatgtaac acgaactgca gcacatgaag atgcgatagc ggtcgcttct 1260
gctaaaaatc aaacagttga gtttgataaa gttaacatag gtggagaaag ttttaaatac 1320
agaaatatag gggccttttt cgataagagt aaaatcacaa caaatgaaga tggaacaaaa 1380
gctcctagta aattaaaatt tgtatatata ggcaaggggc aagaccaaga tttgataggt 1440
ttggatctta ggggcaaaat tgcagtaatg gatagaattt atacaaagga tttaaaaaat 1500
gcttttaaaa aagctatgga taagggtgca cgcgccatta tggttgtaaa tactgtaaat 1560
tactacaata gagataattg gacagagctt ccagctatgg gatatgaagc ggatgaaggt 1620
actaaaagtc aagtgttttc aatttcagga gatgatggtg taaagctatg gaacatgatt 1680
aatcctgata aaaaaactga agtcaaaaga aataataaag aagattttaa agataaattg 1740
gagcaatact atccaattga tatggaaagt tttaattcca acaaaccgaa tgtaggtgac 1800
gaaaaagaga ttgactttaa gtttgcacct gacacagaca aagaactcta taaagaagat 1860
atcatcgttc cagcaggatc tacatcttgg gggccaagaa tagatttact tttaaaaccc 1920
gatgtttcag cacctggtaa aaatattaaa tccacgctta atgttattaa tggcaaatca 1980
acttatggct at                                                     1992
```

<210> 6

<211> 664

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 6

```
Tyr Pro Val Val Leu Ala Asp Thr Ser Ser Ser Glu Asp Ala Leu Asn
1               5                   10                  15

Ile Ser Asp Lys Glu Lys Val Ala Glu Asn Lys Glu Lys His Glu Asn
            20                  25                  30

Ile His Ser Ala Met Glu Thr Ser Gln Asp Phe Lys Glu Lys Lys Thr
        35                  40                  45

Ala Val Ile Lys Glu Lys Glu Val Val Ser Lys Asn Pro Val Ile Asp
    50                  55                  60

Asn Asn Thr Ser Asn Glu Glu Ala Lys Ile Lys Glu Glu Asn Ser Asn
65                  70                  75                  80

Lys Ser Gln Gly Asp Tyr Thr Asp Ser Phe Val Asn Lys Asn Thr Glu
                85                  90                  95

Asn Pro Lys Lys Glu Asp Lys Val Val Tyr Ile Ala Glu Phe Lys Asp
            100                 105                 110

Lys Glu Ser Gly Glu Lys Ala Ile Lys Glu Leu Ser Ser Leu Lys Asn
        115                 120                 125

Thr Lys Val Leu Tyr Thr Tyr Asp Arg Ile Phe Asn Gly Ser Ala Ile
```

130 135 140

Glu Thr Thr Pro Asp Asn Leu Asp Lys Ile Lys Gln Ile Glu Gly Ile
145 150 155 160

Ser Ser Val Glu Arg Ala Gln Lys Val Gln Pro Met Met Asn His Ala
165 170 175

Arg Lys Glu Ile Gly Val Glu Glu Ala Ile Asp Tyr Leu Lys Ser Ile
180 185 190

Asn Ala Pro Phe Gly Lys Asn Phe Asp Gly Arg Gly Met Val Ile Ser
195 200 205

Asn Ile Asp Thr Gly Thr Asp Tyr Arg His Lys Ala Met Arg Ile Asp
210 215 220

Asp Asp Ala Lys Ala Ser Met Arg Phe Lys Lys Glu Asp Leu Lys Gly
225 230 235 240

Thr Asp Lys Asn Tyr Trp Leu Ser Asp Lys Ile Pro His Ala Phe Asn
245 250 255

Tyr Tyr Asn Gly Gly Lys Ile Thr Val Glu Lys Tyr Asp Asp Gly Arg
260 265 270

Asp Tyr Phe Asp Pro His Gly Met His Ile Ala Gly Ile Leu Ala Gly
275 280 285

Asn Asp Thr Glu Gln Asp Ile Lys Asn Phe Asn Gly Ile Asp Gly Ile
290 295 300

Ala Pro Asn Ala Gln Ile Phe Ser Tyr Lys Met Tyr Ser Asp Ala Gly
305 310 315 320

Ser Gly Phe Ala Gly Asp Glu Thr Met Phe His Ala Ile Glu Asp Ser
325 330 335

Ile Lys His Asn Val Asp Val Val Ser Val Ser Ser Gly Phe Thr Gly
340 345 350

Thr Gly Leu Val Gly Glu Lys Tyr Trp Gln Ala Ile Arg Ala Leu Arg
355 360 365

Lys Ala Gly Ile Pro Met Val Val Ala Thr Gly Asn Tyr Ala Thr Ser
370 375 380

Ala Ser Ser Ser Ser Trp Asp Leu Val Ala Asn Asn His Leu Lys Met

385 390 395 400

Thr Asp Thr Gly Asn Val Thr Arg Thr Ala Ala His Glu Asp Ala Ile
405 410 415

Ala Val Ala Ser Ala Lys Asn Gln Thr Val Glu Phe Asp Lys Val Asn
420 425 430

Ile Gly Gly Glu Ser Phe Lys Tyr Arg Asn Ile Gly Ala Phe Phe Asp
435 440 445

Lys Ser Lys Ile Thr Thr Asn Glu Asp Gly Thr Lys Ala Pro Ser Lys
450 455 460

Leu Lys Phe Val Tyr Ile Gly Lys Gly Gln Asp Gln Asp Leu Ile Gly
465 470 475 480

Leu Asp Leu Arg Gly Lys Ile Ala Val Met Asp Arg Ile Tyr Thr Lys
485 490 495

Asp Leu Lys Asn Ala Phe Lys Lys Ala Met Asp Lys Gly Ala Arg Ala
500 505 510

Ile Met Val Val Asn Thr Val Asn Tyr Tyr Asn Arg Asp Asn Trp Thr
515 520 525

Glu Leu Pro Ala Met Gly Tyr Glu Ala Asp Glu Gly Thr Lys Ser Gln
530 535 540

Val Phe Ser Ile Ser Gly Asp Asp Gly Val Lys Leu Trp Asn Met Ile
545 550 555 560

Asn Pro Asp Lys Lys Thr Glu Val Lys Arg Asn Asn Lys Glu Asp Phe
565 570 575

Lys Asp Lys Leu Glu Gln Tyr Tyr Pro Ile Asp Met Glu Ser Phe Asn
580 585 590

Ser Asn Lys Pro Asn Val Gly Asp Glu Lys Glu Ile Asp Phe Lys Phe
595 600 605

Ala Pro Asp Thr Asp Lys Glu Leu Tyr Lys Glu Asp Ile Ile Val Pro
610 615 620

Ala Gly Ser Thr Ser Trp Gly Pro Arg Ile Asp Leu Leu Leu Lys Pro
625 630 635 640

Asp Val Ser Ala Pro Gly Lys Asn Ile Lys Ser Thr Leu Asn Val Ile

645 650 655

Asn Gly Lys Ser Thr Tyr Gly Tyr
660

<210> 7

<211> 2319

<212> ADN

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 7

```
aagcttggcg agattgcaga atctaaattt aaaaatttag gaaatggaaa agagggtagt 60
ctaaaaaaag atacaactgg ggtagaacat catcatcaag aaaatgaaga gtctattaaa 120
gaaaaatcta gttttactat tgatagaaat atttcaacaa ttagagactt tgaaaataaa 180
gacttaaaga aactcattaa aaagaaattt agagaagttg atgattttac aagtgaaact 240
ggtaagagaa tggaggaata cgattataaa tacgatgata aaggaaatat aatagcctac 300
gatgatggga ctgatctaga atatgaaact gagaaacttg acgaaatcaa atcaaaaatt 360
tatggtgttc taagtccgtc taaagatgga cactttgaaa ttcttggaaa gataagtaat 420
gtttctaaaa atgccaaggt atattatggg aataactata aatctataga aatcaaagcg 480
accaagtatg atttccactc aaaaacgatg acatttgatc tatacgctaa tattaatgat 540
attgtggatg gattagcttt tgcaggagat atgagattat ttgttaaaga taatgatcag 600
aaaaaagctg aaattaaaat tagaatgcct gaaaaaatta aggaaactaa atcagaatat 660
ccctatgtat caagttatgg gaatgtcata gaattagggg aaggagatct ttcaaaaaac 720
aaaccagaca atttaactaa aatggaatct ggtaaaatct attctgattc agaaaaacaa 780
caatatctgt taaaggataa tatcattcta agaaaaggct atgcactaaa agtgactacc 840
tataatcctg gaaaaacgga tatgttagaa ggaaatggag tctatagcaa ggaagatata 900
gcaaaaatac aaaaggccaa tcctaatcta agagcccttt cagaaacaac aatttatgct 960
gatagtagaa atgttgaaga tggaagaagt acccaatctg tattaatgtc ggctttggac 1020
ggctttaaca ttataaggta tcaagtgttt acatttaaaa tgaacgataa aggggaagct 1080
atcgataaag acggaaatct tgtgacagat tcttctaaac ttgtattatt tggtaaggat 1140
gataaagaat acactggaga ggataagttc aatgtagaag ctataaaaga agatggctcc 1200
atgttattta ttgataccaa accagtaaac ctttcaatgg ataagaacta ctttaatcca 1260
tctaaatcta ataaaattta tgtacgaaat ccagaatttt atttaagagg taagatttct 1320
gataagggtg gttttaactg ggaattgaga gttaatgaat cggttgtaga taattattta 1380
atctacggag atttacacat tgataacact agagatttta atattaagct gaatgttaaa 1440
gacggtgaca tcatggactg gggaatgaaa gactataaag caaacggatt tccagataag 1500
gtaacagata tggatggaaa tgtttatctt caaactggct atagcgattt gaatgctaaa 1560
gcagttggag tccactatca gtttttatat gataatgtta aacccgaagt aaacattgat 1620
cctaagggaa atactagtat cgaatatgct gatggaaaat ctgtagtctt taacatcaat 1680
gataaaagaa ataatggatt cgatggtgag attcaagaac aacatattta tataaatgga 1740
aaagaatata catcatttaa tgatattaaa caaataatag acaagacact aaacattaag 1800
attgttgtaa aagattttgc aagaaataca accgtaaaag aattcatttt aaataaagat 1860
acgggagagg taagtgaatt aaaacctcat agggtaactg tgaccattca aaatggaaaa 1920
gaaatgagtt caacgatagt gtcggaagaa gattttattt tacctgttta taagggtgaa 1980
ttagaaaaag gataccaatt tgatggttgg gaaatttctg gtttcgaagg taaaaaagac 2040
gctggctatg ttattaatct atcaaaagat acctttataa aacctgtatt caagaaaata 2100
gaggagaaaa aggaggaaga aaataaacct acttttgatg tatcgaaaaa gaaagataac 2160
ccacaagtaa accatagtca attaaatgaa agtcacagaa aagaggattt acaaagagaa 2220
gagcattcac aaaaatctga ttcaactaag gatgttacag ctacagttct tgataaaaac 2280
aatatcagta gtaaatcaac tactaacaat cctaataag                        2319
```

<210> 8

<211> 773

<212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 8

Lys Leu Gly Glu Ile Ala Glu Ser Lys Phe Lys Asn Leu Gly Asn Gly
1 5 10 15

Lys Glu Gly Ser Leu Lys Lys Asp Thr Thr Gly Val Glu His His His
20 25 30

Gln Glu Asn Glu Glu Ser Ile Lys Glu Lys Ser Ser Phe Thr Ile Asp
35 40 45

Arg Asn Ile Ser Thr Ile Arg Asp Phe Glu Asn Lys Asp Leu Lys Lys
50 55 60

Leu Ile Lys Lys Lys Phe Arg Glu Val Asp Asp Phe Thr Ser Glu Thr
65 70 75 80

Gly Lys Arg Met Glu Glu Tyr Asp Tyr Lys Tyr Asp Asp Lys Gly Asn
85 90 95

Ile Ile Ala Tyr Asp Asp Gly Thr Asp Leu Glu Tyr Glu Thr Glu Lys
100 105 110

Leu Asp Glu Ile Lys Ser Lys Ile Tyr Gly Val Leu Ser Pro Ser Lys
115 120 125

Asp Gly His Phe Glu Ile Leu Gly Lys Ile Ser Asn Val Ser Lys Asn
130 135 140

Ala Lys Val Tyr Tyr Gly Asn Asn Tyr Lys Ser Ile Glu Ile Lys Ala
145 150 155 160

Thr Lys Tyr Asp Phe His Ser Lys Thr Met Thr Phe Asp Leu Tyr Ala
165 170 175

Asn Ile Asn Asp Ile Val Asp Gly Leu Ala Phe Ala Gly Asp Met Arg
180 185 190

Leu Phe Val Lys Asp Asn Asp Gln Lys Lys Ala Glu Ile Lys Ile Arg

195 200 205

Met Pro Glu Lys Ile Lys Glu Thr Lys Ser Glu Tyr Pro Tyr Val Ser
210 215 220

Ser Tyr Gly Asn Val Ile Glu Leu Gly Glu Gly Asp Leu Ser Lys Asn
225 230 235 240

Lys Pro Asp Asn Leu Thr Lys Met Glu Ser Gly Lys Ile Tyr Ser Asp
245 250 255

Ser Glu Lys Gln Gln Tyr Leu Leu Lys Asp Asn Ile Ile Leu Arg Lys
260 265 270

Gly Tyr Ala Leu Lys Val Thr Thr Tyr Asn Pro Gly Lys Thr Asp Met
275 280 285

Leu Glu Gly Asn Gly Val Tyr Ser Lys Glu Asp Ile Ala Lys Ile Gln
290 295 300

Lys Ala Asn Pro Asn Leu Arg Ala Leu Ser Glu Thr Thr Ile Tyr Ala
305 310 315 320

Asp Ser Arg Asn Val Glu Asp Gly Arg Ser Thr Gln Ser Val Leu Met
325 330 335

Ser Ala Leu Asp Gly Phe Asn Ile Ile Arg Tyr Gln Val Phe Thr Phe
340 345 350

Lys Met Asn Asp Lys Gly Glu Ala Ile Asp Lys Asp Gly Asn Leu Val
355 360 365

Thr Asp Ser Ser Lys Leu Val Leu Phe Gly Lys Asp Asp Lys Glu Tyr
370 375 380

Thr Gly Glu Asp Lys Phe Asn Val Glu Ala Ile Lys Glu Asp Gly Ser
385 390 395 400

Met Leu Phe Ile Asp Thr Lys Pro Val Asn Leu Ser Met Asp Lys Asn
405 410 415

Tyr Phe Asn Pro Ser Lys Ser Asn Lys Ile Tyr Val Arg Asn Pro Glu
420 425 430

Phe Tyr Leu Arg Gly Lys Ile Ser Asp Lys Gly Gly Phe Asn Trp Glu
435 440 445

Leu Arg Val Asn Glu Ser Val Val Asp Asn Tyr Leu Ile Tyr Gly Asp

450 455 460

Leu His Ile Asp Asn Thr Arg Asp Phe Asn Ile Lys Leu Asn Val Lys
465 470 475 480

Asp Gly Asp Ile Met Asp Trp Gly Met Lys Asp Tyr Lys Ala Asn Gly
485 490 495

Phe Pro Asp Lys Val Thr Asp Met Asp Gly Asn Val Tyr Leu Gln Thr
500 505 510

Gly Tyr Ser Asp Leu Asn Ala Lys Ala Val Gly Val His Tyr Gln Phe
515 520 525

Leu Tyr Asp Asn Val Lys Pro Glu Val Asn Ile Asp Pro Lys Gly Asn
530 535 540

Thr Ser Ile Glu Tyr Ala Asp Gly Lys Ser Val Val Phe Asn Ile Asn
545 550 555 560

Asp Lys Arg Asn Asn Gly Phe Asp Gly Glu Ile Gln Glu Gln His Ile
565 570 575

Tyr Ile Asn Gly Lys Glu Tyr Thr Ser Phe Asn Asp Ile Lys Gln Ile
580 585 590

Ile Asp Lys Thr Leu Asn Ile Lys Ile Val Val Lys Asp Phe Ala Arg
595 600 605

Asn Thr Thr Val Lys Glu Phe Ile Leu Asn Lys Asp Thr Gly Glu Val
610 615 620

Ser Glu Leu Lys Pro His Arg Val Thr Val Thr Ile Gln Asn Gly Lys
625 630 635 640

Glu Met Ser Ser Thr Ile Val Ser Glu Glu Asp Phe Ile Leu Pro Val
645 650 655

Tyr Lys Gly Glu Leu Glu Lys Gly Tyr Gln Phe Asp Gly Trp Glu Ile
660 665 670

Ser Gly Phe Glu Gly Lys Lys Asp Ala Gly Tyr Val Ile Asn Leu Ser
675 680 685

Lys Asp Thr Phe Ile Lys Pro Val Phe Lys Lys Ile Glu Glu Lys Lys
690 695 700

Glu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Phe Asp Val Ser Lys Lys Lys Asp Asn

705 710 715 720

Pro Gln Val Asn His Ser Gln Leu Asn Glu Ser His Arg Lys Glu Asp
725 730 735

Leu Gln Arg Glu Glu His Ser Gln Lys Ser Asp Ser Thr Lys Asp Val
740 745 750

Thr Ala Thr Val Leu Asp Lys Asn Asn Ile Ser Ser Lys Ser Thr Thr
755 760 765

Asn Asn Pro Asn Lys
770

REIVINDICACIONES

1. Una vacuna que comprende como principio activo un polipéptido, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6.

2. Una composición de vacuna según la reivindicación 1, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el polipéptido está presente en una cantidad eficaz para obtener anticuerpos en un animal frente a un organismo del género *Streptococcus*.

3. Una vacuna según la reivindicación 1, en la que el polipéptido se proporciona por un organismo microbiano transformado con polinucleótidos, y que expresa de ese modo el polipéptido de SEQ ID NO: 6 como principio activo de dicha vacuna.

4. La vacuna según la reivindicación 3, para usar en la prevención o atenuación de una infección producida por un miembro del género *Streptococcus* en un animal.

5. La vacuna según la reivindicación 3, en la que dicho microorganismo transformado se selecciona del grupo que consiste en salmonela, micobacteria, estreptococo, virus de la viruela, y adenovirus.

6. Uso de un polipéptido que comprende la SEQ ID NO:6 para la fabricación de una preparación farmacéutica para prevenir o atenuar una infección producida por un miembro del género *Streptococcus* en un animal.

7. Uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:6 para la fabricación de una preparación farmacéutica para prevenir o atenuar una infección producida por un miembro del género *Streptococcus* en un animal.

FIG. 1A

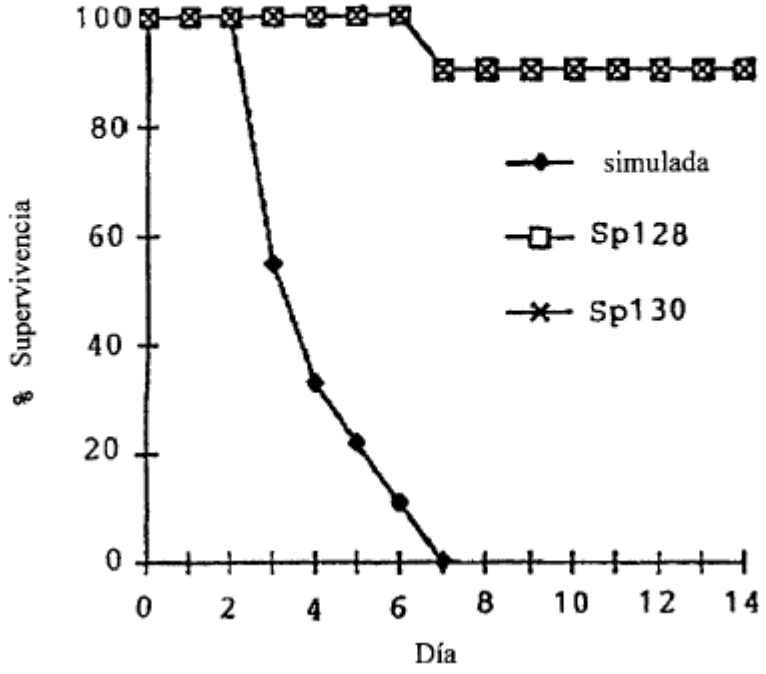

100
80
60
40
20
0
% Supervivencia
0
2
4
6
8
10
12
14
Día
simulada
Sp128
Sp130

FIG. 1B

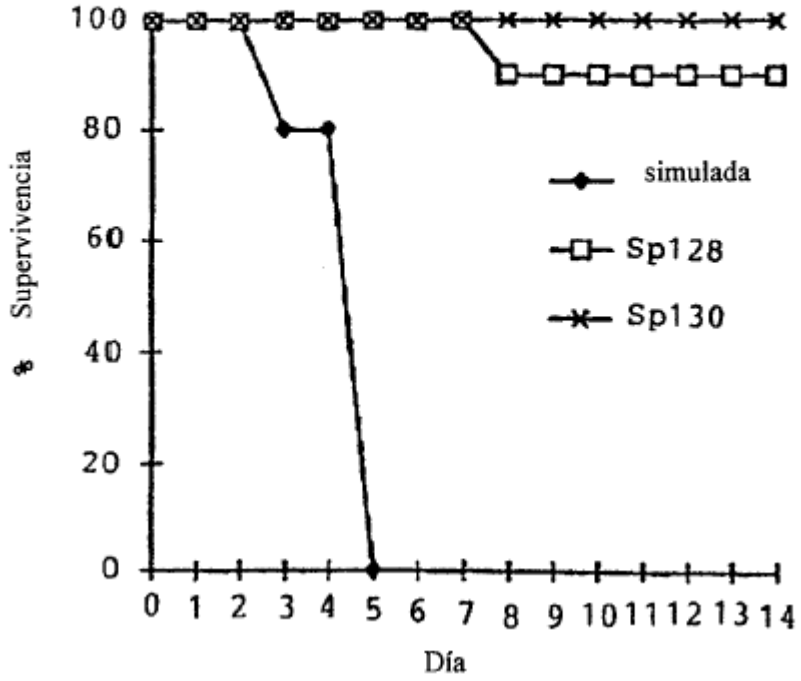

100
80
60
40
20
0
% Supervivencia
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
Día
simulada
Sp128
Sp130

FIG. 2

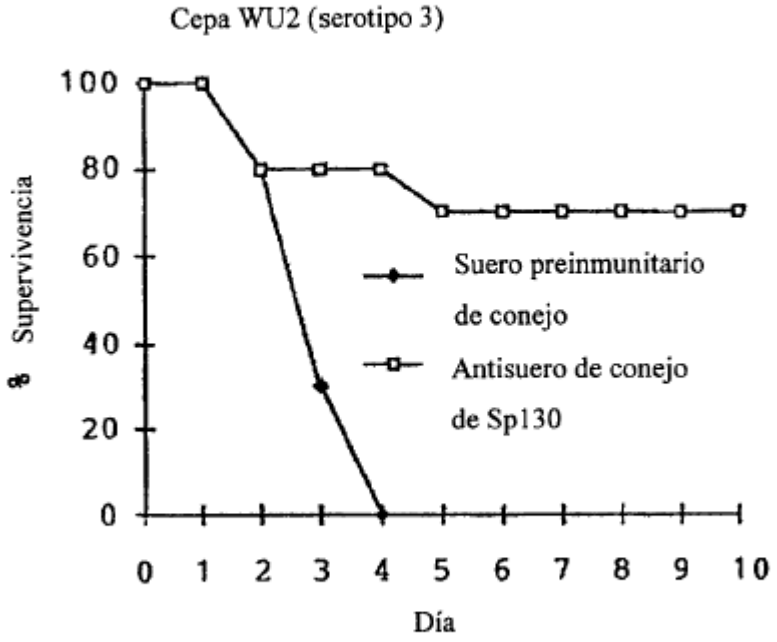
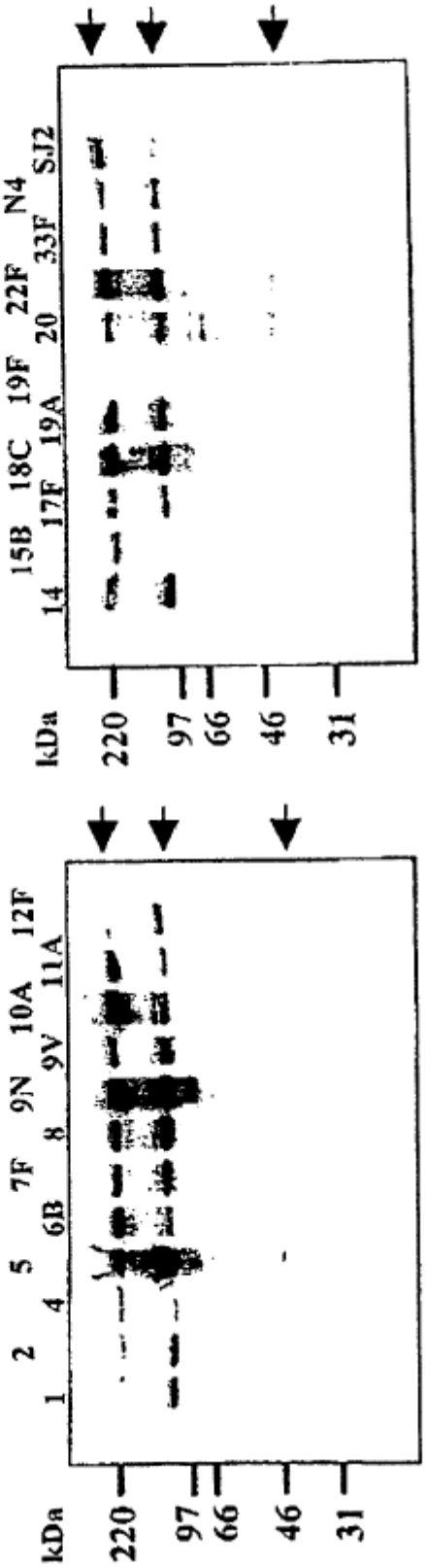

Cepa WU2 (serotipo 3)
% Supervivencia
100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Día
Suero preinmunitario de conejo
Antisuero de conejo de Sp130

FIG. 3


kDa
220
97
66
46
31
1
2
4
5
6B
7F
8
9N
9V
10A
11A
12F
14
15B
17F
18C
19A
19F
20
22F
33F
N4
SJ2

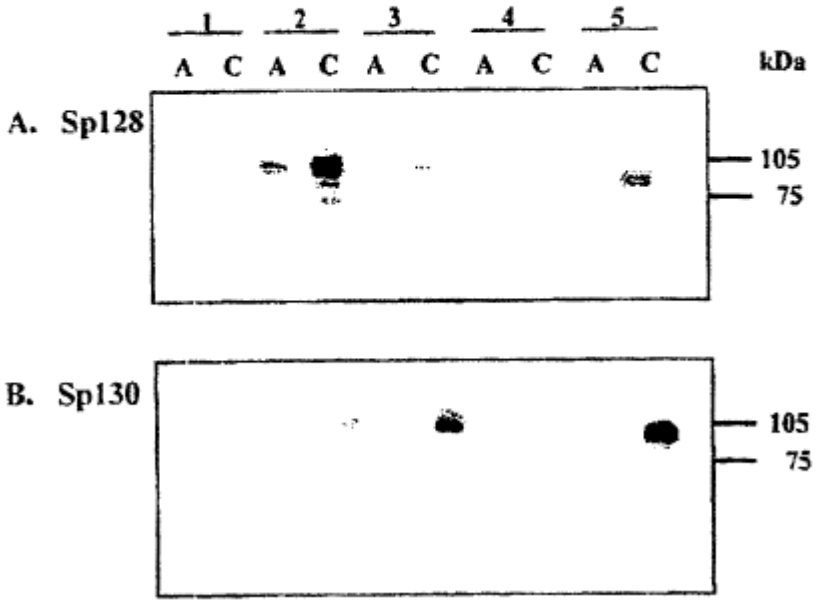



FIG. 4