

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 728**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/285** (2006.01)  
**C12N 15/31** (2006.01)  
**C07K 16/12** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)  
**A61K 39/102** (2006.01)  
**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01976281 .4**  
96 Fecha de presentación: **05.10.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1326885**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

54 Título: **POLIPÉPTIDOS Y POLINUCLEÓTIDOS BASB201 DE HAEMOPHILUS INFLUENZAE NO TIPIFICABLE Y USOS DE LOS MISMOS.**

30 Prioridad:  
**13.10.2000 GB 0025169**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.11.2011**

73 Titular/es:  
**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**  
**RUE DE L'INSTITUT 89**  
**1330 RIXENSART, BE**

72 Inventor/es:  
**THONNARD, Joelle**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 728 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**

Polipéptidos y polinucleótidos BASB201 de *Haemophilus influenzae* no tipificable y usos de los mismos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a polinucleótidos (denominados en el presente documento "polinucleótido(s) BASB201"), a polipéptidos codificados por ellos (denominados en el presente documento "BASB201" o "polipéptido(s) BASB201"), a materiales recombinantes y a procedimientos para su producción. En otro aspecto, la presente invención se refiere procedimientos para usar dichos polipéptidos y polinucleótidos, incluyendo vacunas contra infecciones bacterianas. En un aspecto adicional, la invención se refiere a ensayos diagnósticos para detectar infección por ciertos patógenos.

10 **Antecedentes de la invención**

*Haemophilus influenzae* es una bacteria gramnegativa no móvil. El hombre es su único huésped natural.

Normalmente, los aislados de *H. influenzae* se clasifican según su cápsula polisacárida. Se han identificado seis tipos capsulares diferentes designados de la a a la f. Los aislados que no consiguen aglutinarse con antisuero cultivado contra uno de estos seis serotipos se clasifican como no tipificables y no expresan una cápsula.

15 El *H. influenzae* tipo b es claramente diferente de los otros tipos, ya que es la causa principal de la meningitis bacteriana y de enfermedades sistémicas. Los *H. influenzae* no tipificables (NTHi) sólo se aíslan ocasionalmente de la sangre de pacientes con una enfermedad sistémica.

Los NTHi constituyen una causa habitual de neumonía, exacerbación de bronquitis crónica, sinusitis y otitis media.

20 La otitis media es una enfermedad infantil importante tanto por el número de casos como por sus potenciales secuelas. Cada año se registran en Estados Unidos más de 3,5 millones de casos y se estima que el 80% de los niños ha experimentado al menos un episodio de otitis antes de alcanzar la edad de tres años (1). Si se deja sin tratar, o si se vuelve crónica, esta enfermedad puede dar lugar a pérdida de audición, que puede ser temporal (en el caso de acumulación de fluidos en el oído medio) o permanente (si el nervio auditivo está dañado). En lactantes, esas pérdidas de audición pueden ser responsables del retraso en el aprendizaje del habla.

25 Tres especies bacterianas se aíslan principalmente del oído medio de niños con otitis media: *Streptococcus pneumoniae*; NTHi y *M. catarrhalis*. Éstas están presentes en un 60 a 90% de los casos. Una revisión de estudios recientes demuestra que *S. pneumoniae* y NTHi representan cada una de ellos un 30% aproximadamente y *M. catarrhalis* un 15% aproximadamente de los casos de otitis media (2). Se pueden aislar otras bacterias del oído medio (*H. influenzae* tipo B, *S. pyogenes*,...) pero a una frecuencia mucho menor (2 % de los casos o inferior).

30 Los datos epidemiológicos indican que, para los patógenos encontrados en el oído medio, la colonización del tracto respiratorio superior es un prerrequisito absoluto para el desarrollo de una otitis; no obstante, también son necesarios otros factores para dar lugar a la enfermedad (3-9). Estos son importantes para desencadenar la migración de las bacterias hacia el oído medio a través de las trompas de Eustaquio, seguida de la iniciación de un proceso inflamatorio. Hasta la fecha, estos otros factores se desconocen. Se ha propuesto que, por ejemplo, una anomalía transitoria del sistema inmunitario después de una infección vírica podría provocar una incapacidad para controlar la colonización del tracto respiratorio (5). Una explicación alternativa es que la exposición a factores medioambientales permite una colonización más importante de algunos niños, que, posteriormente, se vuelven susceptibles al desarrollo de otitis media debido a la presencia constante de patógenos en el oído medio (2).

40 Se puede acceder a *H. influenzae* Rd sección 75 de 163, 9 de agosto de 1995 (1995-08-09) en la base de datos de EMBL [online] EBI con número de registro U32760.

La proteína hipotética H10756 de *H. influenzae* se puede recuperar en la base de datos SWISSPROT [online] con número de registro P44864,

Se ha demostrado que diversas proteínas de *H. influenzae* están involucradas en la patogenia o se ha demostrado que confieren protección después de la vacunación en modelos animales.

45 Se ha informado de la adherencia del NTHi a células epiteliales de la nasofaringe humana (10). Además de las fimbrias y las pilosidades (11-15), se han identificado muchas adhesinas en NTHi. Entre ellas, dos proteínas de alto peso molecular expuestas en la superficie denominadas HMW1 y HMW2 han demostrado mediar en la adhesión de NTHi a células epiteliales (16). Otra familia de proteínas de alto peso molecular ha sido identificada en cepas de NTHi que carecen de proteínas pertenecientes a la familia HMW1/HMW2. La proteína Hia de 115 kDa de NTHi (17) es muy similar a la adhesina Hsf expresada por cepas de *H. influenzae* de tipo b (18). Otra proteína, la proteína Hap muestra similitudes con las serinproteasas IgA1 y se ha demostrado que está involucrada tanto en la adhesión como en la entrada a la célula (19).

50 Se han identificado y se han numerado cinco proteínas mayoritarias de la membrana exterior (OMP).

En los estudios originales usando cepas de *H. influenzae* de tipo b demostraron que los anticuerpos específicos para P1 y P2 protegían a ratas no adultas frente a exposiciones posteriores (20-21). Se ha encontrado que la P2 es capaz de inducir anticuerpos bacterianos y opsonicos, que están dirigidos contra las regiones variables presentes en las estructuras en bucle expuestas sobre la superficie de esta OMP integral (22-23). La lipoproteína P4 también podía inducir anticuerpos bactericidas (24).

P6 es una lipoproteína asociada con péptidoglicano conservada que constituye hasta el 1-5% de la membrana externa (25). Posteriormente se identificó una lipoproteína de aproximadamente el mismo peso molecular, denominada PCP (proteína de reacción cruzada con P6) (26). Una mezcla de las lipoproteínas conservadas P4, P6 y PCP no reveló ninguna protección tal y como se mide en un modelo de otitis media en chinchilla (27). La P6 sola parece inducir protección en el modelo de chinchilla (28).

La P5 tiene una homología de secuencia con la OmpA integral de *Escherichia coli* (29-30). La P5 parece experimentar una deriva antigénica durante infecciones persistentes con NTHi (31). No obstante, regiones conservadas de esta proteína indujeron protección en el modelo de chinchilla de otitis media.

En línea con las observaciones realizadas con gonococos y meningococos, el NTHi expresa un receptor doble de transferrina humana compuesto por TbpA y TbpB cuando se cultivan con limitación de hierro. Los anti-TbpB protegían a ratas lactantes. (32). También se han descrito para NTHi receptores de hemoglobina/haptoglobina (33). También se ha identificado un receptor para Haem:Hemopexina (34). En el NTHi también hay un receptor de lactoferrina, pero aún no se ha caracterizado (35).

Una OMP de 80 kDa, el antígeno de superficie D15, proporciona protección frente a NTHi en un modelo de exposición en ratón. (36). Una lipoproteína de la membrana exterior de 42 kDa, la LPD, está conservada entre los *Haemophilus influenzae* e induce anticuerpos bactericidas (37). Se ha encontrado que una OMP minoritaria de 98 kDa (38) es un antígeno protector, esta OMP puede ser perfectamente una de las OMP inducibles por la limitación de Fe o de las adhesinas de alto peso molecular que se han caracterizado. *H. influenzae* produce actividad de proteasa IgA1 (39). Las proteasas IgA1 de NTHi presentan un alto grado de variabilidad antigénica (40).

Se ha demostrado que otra OMP de NTHi, la OMP26, una proteína de 26 kDa, aumenta el aclaramiento pulmonar en un modelo de rata (41). También se ha demostrado que la proteína HtrA de NTHi es un antígeno protector. De hecho, esta proteína ha protegido a la chinchilla frente a otitis media y ha protegido a ratas lactantes frente a la bacteriemia producida por *H. influenzae* de tipo b (42).

#### Referencias de los antecedentes

1. Klein, JO (1994) Clin. Inf. Dis 19:823
2. Murphy, TF (1996) Microbiol. Rev. 60:267
3. Dickinson, DP y col., (1988) J. Infect. Dis. 158:205
4. Faden, HL y col., (1991) Ann. Otorhinol. Laryngol. 100:612
5. Faden, HL y col., (1994) J. Infect. Dis. 169:1312
6. Leach, AJ y col., (1994) J. Infect. Dis. 169:1312
7. Prellner, KP y col., (1984) Acta Otolaryngol. 98:343
8. Stenfors, L-E y Raisanen, S. (1992) J. Infect. Dis. 165:1148
9. Stenfors, L-E y Raisanen, S. (1994) Acta Otolaryngol. 113:191
10. Read, RC. y col., (1991) J. Infect. Dis. 163:549
11. Brinton, CC. y col., (1989) Pediatr. Infect. Dis. J. 8:S54
12. Kar, S. y col., (1990) Infect. Immun. 58:903
13. Gildorf, JR. y col., (1992) Infect. Immun. 60:374
14. St. Geme, JW y col., (1991) Infect. Immun. 59:3366
15. St. Geme, JW y col., (1993) Infect. Immun. 61: 2233
16. St. Geme, JW. y col., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2875
17. Barenkamp, SJ. y JW St Geme (1996) Mol. Microbiol. (In press)
18. St. Geme, JW. y col., (1996) J. Bact. 178:6281
19. St. Geme, JW. y col., (1994) Mol. Microbiol. 14:217
20. Loeb, MR. y col., (1987) Infect. Immun. 55:2612
21. Musson, RS. Jr. y col., (1983) J. Clin. Invest. 72:677
22. Haase, EM. y col., (1994) Infect. Immun. 62:3712
23. Troelstra, A. y col., (1994) Infect. Immun. 62:779
24. Green, BA. y col., (1991) Infect. Immun. 59:3191
25. Nelson, MB. y col., (1991) Infect. Immun. 59:2658
26. Deich, RM. y col., (1990) Infect. Immun. 58:3388
27. Green, BA. y col., (1993) Infect. Immun. 61:1950
28. Demaria, TF. y col., (1996) Infect. Immun. 64:5187
29. Miyamoto, N., Bakaletz, LO (1996) Microb. Pathog. 21:343
30. Munson, RS.j.r. y col., (1993) Infect. Immun. 61:1017
31. Duim, B. y col., (1997) Infect. Immun. 65:1351

32. Loosmore, SM. et al(1996) Mol.Microbiol. 19:575  
 33. Maciver, I. y col., (1996) Infect. Immun. 64:3703  
 34. Cope, LD. y col., (1994) Mol.Microbiol. 13:868  
 35. Schryvers, AB. y col., (1989) J. Med. Microbiol. 29:121  
 36. Flack, FS. y col., (1995) Gene 156:97  
 37. Akkoyunlu, M. y col., (1996) Infect. Immun. 64:4586  
 38. Kimura, A. y col., (1985) Infect. Immun. 47:253  
 39. Mulks, MH. y Shoberg, RJ (1994) Meth. Enzymol. 235:543  
 40. Lomholt, H. Alphen, Lv, Kilian, M. (1993) Infect. Immun. 61:4575  
 41. Kyd, J.M. y Cripps, A.W. (1998) Infect. Immun. 66:2272  
 42. Loosmore, S.M. y col., (1998) Infect. Immun. 66:899

La frecuencia de las infecciones por NTHi se ha incrementado drásticamente en las últimas décadas. Este fenómeno ha generado unas necesidades médicas no satisfechas de nuevos agentes antimicrobianos, vacunas, procedimientos de selección de fármacos y pruebas diagnósticas para este organismo. . La presente invención tiene el objetivo de satisfacer esta necesidad.

### **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a BASB201, en particular a polipéptidos BASB201 y polinucleótidos BASB201, a materiales recombinantes y a procedimientos para su producción. En otro aspecto, la presente invención se refiere procedimientos para usar dichos polipéptidos y polinucleótidos, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades microbianas, entre otras. En otro aspecto, la invención se refiere a ensayos diagnósticos para detectar enfermedades asociadas con infecciones microbianas y afecciones asociadas con dichas infecciones, tales como ensayos para detectar la expresión o actividad de los polinucleótidos o polipéptidos BASB201.

### **Descripción de la invención**

La invención se refiere a polipéptidos y polinucleótidos BASB201 como se describen con mayor detalle a continuación. En particular, la invención se refiere a polipéptidos y polinucleótidos BASB201 de *H. influenzae* no tipificable. El polipéptido BASB201 tiene una secuencia señal característica de una lipoproteína. Esta secuencia señal se ha escindido en la proteína madura. Por tanto, la proteína madura podría estar expuesta en la superficie de la bacteria. La proteína madura tiene dos dominios distintos. El dominio N-terminal se localiza entre el residuo 32 y el residuo 300 del polipéptido BASB201 y es una region rica en KEQ. Esta región rica de repeticiones se encuentra en algunas proteínas secretadas. El dominio C-terminal se localiza entre el residuo 301 y el residuo 400 del polipéptido BASB201 y es un dominio de tipo peptidasa M37. El dominio M37 se encuentra en algunas proteínas endopeptidasa.

La invención se refiere de manera especial a polinucleótidos BASB201 y polipéptidos codificados que se exponen en la tabla A. Dichos polinucleótidos y polipéptidos codificados tienen las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos establecidas en la SEC ID N° 1 a la SEC ID N° 10, tal como se describe en la tabla A.

Tabla A

Cepa	Aislada en	de	Secuencia de nucleótidos	Secuencia peptídica
3224A	EE.UU.	Otitis media	SEC ID N° 1	SEC ID N° 2
3219C	EE.UU.	Otitis media	SEC ID N° 3	SEC ID N° 4
27W116791N1	DK	Fibrosis quística	SEC ID N° 5	SEC ID N° 6
A840164	NL	Cepa portadora	SEC ID N° 7	SEC ID N° 8

Se entiende que las secuencias citadas de nuevo en el Listado de secuencias que figura más adelante como "ADN" representan una ejemplificación de una forma de realización de la invención, puesto que los expertos en la técnica reconocerán que esas secuencias se pueden emplear de forma útil en polinucleótidos en general, incluidos ribopolinucleótidos.

Las secuencias de los polinucleótidos BASB201 se establecen en las SEC ID N° 1, 3, 5, 7. La SEC del Grupo 1 se refiere en el presente documento a uno cualquiera de los polinucleótidos establecidos en las SEC ID N° 1, 3, 5, 7. Las secuencias de los polipéptidos codificados por BASB201 se establecen en las SEC ID N° 2, 4, 6, 8. La SEC del Grupo 2 se refiere en el presente documento a uno cualquiera de los polipéptidos codificados establecidos en las SEC ID N° 2, 4, 6, 8.

**Polipéptidos**

En un aspecto de la invención se proporcionan polipéptidos de *H. influenzae* no tipificable denominados en el presente documento "BASB201" y "polipéptidos BASB201" así como variantes biológica, diagnóstica, profiláctica, clínica o terapéuticamente útiles de los mismos y composiciones que los comprenden.

5 La presente invención proporciona además un polipéptido aislado que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de: a) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 99 % o es exacta a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 2 o 6 sobre la longitud completa de dicha secuencia; o b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 97-99% o es exacta a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 4 u 8 sobre la longitud completa de dicha secuencia.

10 La invención también proporciona composiciones que comprenden los polipéptidos de la invención.

Los polipéptidos BASB201 proporcionados en la SEC del Grupo 2 son los polipéptidos BASB201 de las cepas de *H. influenzae* no tipificables como se ha descrito en la tabla A.

15 La composición de la invención puede comprender un fragmento inmunógeno de un polipéptido BASB201, esto es, una porción contigua del polipéptido BASB201 que tiene la misma, o sustancialmente la misma, actividad inmunógena que el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos correspondiente seleccionada de la SEC del Grupo 2; es decir, el fragmento (si fuera necesario, cuando se encuentra acoplado a un vehículo) es capaz de generar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido BASB201. Dicho fragmento inmunógeno puede incluir, por ejemplo, el polipéptido BASB201 que carece de una secuencia líder en N-terminal, y/o un dominio transmembrana y/o un dominio de anclaje en C-terminal. Preferentemente, el fragmento inmunógeno de BASB201  
20 comprende sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido que tiene al menos una identidad del 90%, preferentemente al menos una identidad del 95%, lo más preferentemente al menos una identidad del 97-99%, con la de una secuencia seleccionada de la SEC del Grupo 2 sobre la longitud completa de dicha secuencia.

25 Un fragmento es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es enteramente igual, como parte, pero no toda, de cualquier secuencia de aminoácidos de cualquier polipéptido de la invención. Como con los polipéptidos BASB201, los fragmentos pueden estar "libres" o comprendidos dentro de un polipéptido más grande del cual forman una parte o región, lo más preferentemente como una única región continua en un solo polipéptido más grande.

30 Los fragmentos preferidos incluyen, por ejemplo, polipéptidos truncados que tienen una porción de una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC del Grupo 2 o de sus variantes, tal como una serie continua de residuos que incluye una secuencia de aminoácidos amino- y/o carboxi-terminal. También se prefieren las formas de degradación de los polipéptidos de la invención producidas por o en una célula hospedadora. Los fragmentos más preferidos están caracterizados por atributos estructurales o funcionales tales como fragmentos que comprenden alfa-hélices y regiones que forman alfa-hélices, láminas beta y regiones que forman láminas  $\beta$ , giros y regiones que forman giros, enrrollamientos y regiones que forman enrrollamientos, regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones alfa anfipáticas, regiones beta anfipáticas, regiones flexibles, regiones que forman superficies, región de unión al sustrato, y regiones con un alto índice antigénico.  
35

40 Los fragmentos para su uso en la invención incluyen un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 15, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos a partir de una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC del Grupo 2 o un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 15, 20, 30, 40, 50 o 100 aminoácidos contiguos truncados o eliminados de una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC del Grupo 2.

45 El polipéptido BASB201 tiene dos dominios distintos. El dominio N-terminal se localiza entre el residuo 32 y el residuo 300 del polipéptido BASB201 y es una región rica en KEQ. Esta región rica de repeticiones se encuentra en algunas proteínas secretadas. El dominio C-terminal se localiza entre el residuo 301 y el residuo 400 del polipéptido BASB201 y es un dominio de tipo peptidasa M37. El dominio M37 se encuentra en algunas proteínas endopeptidasa. Los fragmentos preferidos incluyen estos dominios presentes en los polipéptidos de la SEC del Grupo 2.

Otros fragmentos preferidos adicionales son aquellos que comprenden un epitopo para linfocitos B o linfocitos T colaboradores, por ejemplo, los fragmentos/péptidos descritos en el Ejemplo 13.

50 Los fragmentos de los polipéptidos útiles en la invención se pueden emplear para producir el polipéptido de longitud completa correspondiente mediante síntesis peptídica; por tanto, estos fragmentos se pueden emplear como intermedios para la producción de los polipéptidos de longitud completa de la invención.

Particularmente preferidas son las variantes en las que varios, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 ó 1 aminoácidos se sustituyen, eliminan, o añaden en cualquier combinación.

55 Los polipéptidos o fragmentos inmunógenos de la invención útiles en la invención pueden estar en forma de la proteína "madura" o pueden ser una parte de una proteína más grande, tal como un precursor o una proteína de

fusión. A menudo es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contenga secuencias secretoras o líderes, pro-secuencias, secuencias que ayudan en la purificación, tales como múltiples residuos de histidina, o una secuencia adicional para la estabilidad durante la producción recombinante. Además, también se debe considerar la adición de un polipéptido exógeno o una cola lipídica o secuencias de polinucleótidos para incrementar la inmunogenicidad potencial de la molécula final.

En una realización, la invención se refiere a proteínas de fusión solubles modificadas genéticamente que comprenden un polipéptido de la presente invención, o un fragmento del mismo, útil en la invención y diversas porciones I de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de varias subclases (IgG, IgM, IgA, IgE). Como inmunoglobulina preferida está la parte constante de la cadena pesada de la IgG humana, particularmente la IgG1, en la que la fusión tiene lugar en la región bisagra. En una forma de realización particular, la parte Fc se puede eliminar simplemente con la incorporación de una secuencia de escisión que se puede escindir con el factor de coagulación sanguíneo Xa.

Además, la presente invención se refiere a procedimientos para la preparación de estas proteínas de fusión mediante ingeniería genética y a su uso para la selección de fármacos, diagnóstico y terapia. La invención también se refiere a polinucleótidos que codifican esas proteínas de fusión. Ejemplos de tecnología para proteínas de fusión se pueden encontrar en las Solicitudes de patente internacional N° WO94/29458 y WO94/22914.

Las proteínas se pueden conjugar químicamente, o se pueden expresar en forma de proteínas de fusión recombinantes, que permiten que se produzcan niveles incrementados en un sistema de expresión comparados con una proteína no fusionada. El compañero de fusión puede ayudar a proporcionar epítopos de linfocitos T colaboradores (compañero de fusión inmunológico), preferentemente epítopos de linfocitos T ayudantes colaboradores por seres humanos, o ayudar en la expresión de la proteína (potenciador de la expresión) con rendimientos más elevados que la proteína recombinante nativa. Preferentemente, el compañero de fusión será tanto un compañero de fusión inmunológico como un compañero que potencie la expresión.

Los compañeros de fusión incluyen la proteína D de *Haemophilus influenzae* y la proteína no estructural del virus de la gripe, NS 1 (hemaglutinina). Otro compañero de fusión es la proteína conocida como Omp26 (WO 97/01638). Otro compañero de fusión es la proteína conocida como LytA. Preferentemente se usa la porción C-terminal de la molécula. La LytA se deriva de *Streptococcus pneumoniae* que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa, la amidasa LytA, (codificada por el gen *lytA* {Gene, 43 (1986) pág. 265-272}) una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces en el esqueleto de péptidoglicano. El dominio C-terminal de la proteína LytA es responsable de la afinidad por la colina o por algunos análogos de la colina tales como el DEAE. Esta propiedad se ha explotado para el desarrollo de plásmidos de expresión C-LytA en *E. coli* útiles para la expresión de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LytA en su término amino {Biotechnology: 10, (1992) pág. 795-798}. Es posible usar la porción repetida de la molécula LytA encontrada en el extremo C-terminal que comienza en el residuo 178, por ejemplo, los residuos 188-305.

También se describen variantes de los polipéptidos anteriormente mencionados, esto es, polipéptidos que varían de los referentes en sustituciones de aminoácidos conservativas, en las que un residuo es sustituido por otro con características similares. De estas sustituciones las típicas se dan entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; y entre los residuos básicos Lys y Arg; o los residuos aromáticos Phe y Tyr.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden preparar de cualquier manera adecuada. Esos polipéptidos incluyen polipéptidos aislados de origen natural, polipéptidos producidos de manera recombinante, polipéptidos producidos sintéticamente o polipéptidos producidos por una combinación de estos procedimientos. Los medios para la preparación de dichos polipéptidos son muy conocidos en la técnica.

Lo más preferido es que un polipéptido de la invención se derive de *H. influenzae* no tipificable, no obstante, preferentemente se puede obtener a partir de otros organismos del mismo género taxonómico. Un polipéptido de la invención también se puede obtener, por ejemplo, de organismos de la misma familia u orden taxonómico.

### **Polinucleótidos**

Es un objetivo de la invención proporcionar polinucleótidos que codifican polipéptidos BASB201, particularmente polinucleótidos que codifican los polipéptidos denominados en el presente documento BASB201.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un polinucleótido aislado que comprende o está constituido por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado de:

- a) una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 99 % o es exacta a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 2 o 6 sobre la longitud completa de dicha secuencia; o
- b) un polipéptido que tiene al menos 97-99% o es exacta a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 4 u 8 sobre la longitud completa de dicha secuencia;

o una secuencia de nucleótidos complementaria a dicho polinucleótido aislado.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un polinucleótido aislado que comprende o está constituido por una secuencia de nucleótidos seleccionada de:

- 5 a) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una identidad de al menos 99 % o es exacta a una secuencia de ADN seleccionada de las SEC ID N° 1, 3 o 5 sobre la longitud completa de dicha secuencia; o  
 b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 97-99% o es exacta a una secuencia de ADN seleccionada de la SEC ID N° 7 sobre la longitud completa de dicha secuencia;

o una secuencia de nucleótidos complementaria a dicho polinucleótido aislado.

10 En una forma de realización particularmente preferida de la invención, los polinucleótidos comprenden una región que codifica polipéptidos BASB201 que comprenden secuencias establecidas en la SEC del Grupo 1 que incluye el gen de longitud completa, o una de sus variantes.

Los polinucleótidos BASB201 proporcionados en la SEC del Grupo 1 son los polinucleótidos BASB201 de las cepas de *H. influenzae* no tipificables como se ha descrito en la tabla A.

15 Se describen moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican y/o expresan polipéptidos y polinucleótidos BASB201, particularmente polipéptidos y polinucleótidos BASB201 de *H. influenzae* no tipificable, incluyendo, por ejemplo, ARN sin procesar, ARN de ribozimas, ARNm, ADNc, ADN genómico, ADN B y Z. Formas de realización adicionales de la invención incluyen polinucleótidos y polipéptidos biológica, diagnóstica, profiláctica, clínica o terapéuticamente útiles, y sus variantes, y composiciones que comprenden los mismos.

20 Los polinucleótidos aislados pueden incluir al menos un gen de longitud completa, que codifica un polipéptido BASB201 que tiene una secuencia de aminoácidos deducida de la SEC del Grupo 2 y polinucleótidos íntimamente relacionados con ellos y sus variantes.

En otra forma de realización particularmente preferida de la invención se hace referencia a polipéptidos BASB201 de *H. influenzae* no tipificable que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC del Grupo 2 o una de sus variantes.

25 Usando la información proporcionada en el presente documento, tal como una secuencia de polinucleótidos establecida en la SEC del Grupo 1, se puede obtener un polinucleótido de la invención que codifica polipéptidos BASB201 usando procedimientos de clonación y selección habituales, tales como aquellos para la clonación y secuenciación de fragmentos de ADN cromosómico a partir de bacterias usando como material de partida la cepa de células 3224A de *H. influenzae* no tipificable, seguido de la obtención de un clon de longitud completa. Por ejemplo, para obtener una secuencia de polinucleótidos de la invención, tal como una secuencia de polinucleótidos dada en la SEC del Grupo 1, normalmente una biblioteca de clones de ADN cromosómico de la cepa 3224A de *H. influenzae* no tipificable en *E. coli* o algún otro hospedador adecuado se analiza con una sonda con un oligonucleótido radiomarcado, preferentemente un 17-mero o más largo, derivado de una secuencia parcial. Los clones portadores de ADN idéntico al de la sonda se pueden distinguir usando condiciones de hibridación rigurosas. Secuenciando los clones individuales identificados de esta forma mediante hibridación con cebadores de secuenciación diseñados a partir de la secuencia del polipéptido o polinucleótido original, es posible extender la secuencia del polinucleótido en ambas direcciones para determinar la secuencia de un gen de longitud completa. De manera conveniente, esa secuenciación se lleva a cabo, por ejemplo, usando ADN de doble cadena desnaturado preparado a partir del clon de un plásmido. Las técnicas adecuadas se describe en Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook y col., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). (véase, en particular, Screening By Hybridization 1.90 y SEcuencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70). También se puede llevar a cabo la secuenciación directa de ADN genómico para obtener una secuencia génica de longitud completa. Ilustrativos de la invención, cada polinucleótido expuesto en la SEC del Grupo 1 se descubrió en una biblioteca de ADN derivada de *H. influenzae* no tipificable.

45 Además, cada secuencia de ADN expuesta en la SEC del Grupo 1 contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína que tiene aproximadamente el número de residuos aminoácidos expuestos en la SEC del Grupo 2, con un peso molecular deducido que se puede calcular usando los valores del peso molecular de los residuos aminoácidos muy conocidos por los expertos en la materia.

50 Los polinucleótidos de la SEC del Grupo 1, entre el codón de iniciación y el codón de terminación, codifican, respectivamente, los polipéptidos de la SEC del Grupo 2. El número de nucleótidos del codón de iniciación y el primer nucleótido del codón de terminación se indican en la tabla B para cada polinucleótido de la SEC del Grupo 1.

Tabla B

Secuencia de nucleótidos	Secuencia peptídica codificada	Codón de iniciación	1er nucleótido del codón de terminación
SEC ID N° 1	SEC ID N° 2	1	1231
SEC ID N° 3	SEC ID N° 4	1	1231
SEC ID N° 5	SEC ID N° 6	1	1231
SEC ID N° 7	SEC ID N° 8	1	1231

Se puede obtener un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, incluyendo homólogos y ortólogos de especies distintas a *H. influenzae* no tipificable, mediante un procedimiento que comprende las etapas de selección de una biblioteca apropiada en condiciones de hibridación rigurosas (por ejemplo, usando una temperatura en el intervalo de 45-65 °C y una concentración de SDS de 0,1-1 %) con una sonda marcada o detectable que consta de o comprende cualquier secuencia seleccionada entre la SEC del Grupo 1 o uno de sus fragmentos; y el aislamiento de un gen de longitud completa y/o clones genómicos que contienen dicha secuencia de polinucleótidos.

La invención proporciona una secuencia de polinucleótidos idéntica a lo largo de su longitud completa a una secuencia codificadora (marco de lectura abierto) establecida en la SEC del Grupo 1. Además, se describe una secuencia codificadora para un polipéptido maduro o para uno de sus fragmentos, por sí misma así como una secuencia codificadora para un polipéptido maduro o un fragmento en un marco de lectura con otra secuencia codificadora, tal como una secuencia que codifica una secuencia líder o secretora, una secuencia de una pre-, o pro-, o prepro-proteína. El polinucleótido de la invención también puede contener al menos una secuencia no codificadora, incluyendo por ejemplo, entre otras, al menos una secuencia 5' y 3' no codificadora, tales como las secuencias transcritas pero no traducidas, señales de terminación (tales como señales de terminación dependientes de rho e independientes de rho), sitios de unión a ribosomas, secuencias de Kozak, secuencias que estabilizan el ARNm, intrones y señales de poliadenilación. La secuencia de polinucleótidos también puede comprender secuencias codificadoras adicionales que codifican aminoácidos adicionales. Por ejemplo, puede estar codificada una secuencia marcadora que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas formas de realización de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexa-histidina, como se proporciona en el vector pQE (Qiagen, Inc.) y como se describe en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86: 821-824 (1989), o una marca peptídica HA (Wilson y col., Cell 37: 767 (1984), que pueden ser ambas útiles en la purificación de una secuencia de polipéptidos fusionada a ellas. Los polinucleótidos útiles en la invención también incluyen, entre otros, polinucleótidos que comprenden un gen estructural y sus secuencias asociadas de manera natural que controlan la expresión del gen.

La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido BASB201 de la SEC del Grupo 2 puede ser idéntica a la secuencia que codifica el polinucleótido correspondiente de la SEC del Grupo 1. La posición del primero y del último nucleótido de las secuencias codificadoras de la SEC del Grupo 1 se indica en la tabla C. Como alternativa, puede ser cualquier secuencia, que, como resultado de la redundancia (degeneración) del código genético, también codifica un polipéptido de la SEC del Grupo 2

Tabla C

Secuencia de nucleótidos	Secuencia peptídica codificada	Codón de iniciación	Último nucleótido de la secuencia codificadora
SEC ID N° 1	SEC ID N° 2	1	1230
SEC ID N° 3	SEC ID N° 4	1	1230
SEC ID N° 5	SEC ID N° 6	1	1230
SEC ID N° 7	SEC ID N° 8	1	1230

La expresión "polinucleótido que codifica un polipéptido" como se usa en el presente documento engloba polinucleótidos que incluyen una secuencia que codifica un polipéptido de la invención, particularmente un polipéptido bacteriano y más particularmente un polipéptido BASB201 de *H. influenzae* no tipificable que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las secuencias de la SEC del Grupo 2. El término también engloba polinucleótidos que incluyen una sola región continua o regiones discontinuas que codifican el polipéptido (por ejemplo, polinucleótidos interrumpidos por fagos integrados, una secuencia de inserción integrada, una



secuencia de un vector integrado, una secuencia de un transposón integrado, o debido a la edición del ARN o a la reorganización del ADN genómico) junto con regiones adicionales, que también pueden contener secuencias codificadoras y/o no codificadoras.

5 También se describen variantes de los polinucleótidos descritos en el presente documento que codifican variantes de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos deducida de cualquiera de las secuencias de la SEC del Grupo 2. Se pueden usar fragmentos de polinucleótidos de la invención para, por ejemplo, sintetizar polinucleótidos de longitud completa de la invención.

10 Fragmentos preferidos son los polinucleótidos que comprenden un epítipo para linfocitos B o linfocitos T colaboradores, por ejemplo, los fragmentos/péptidos descritos en el Ejemplo 13 y genes quiméricos recombinantes que comprenden dichos fragmentos de polinucleótidos.

15 También se describen polinucleótidos que codifican variantes de BASB201, que tienen la secuencia de aminoácidos del polipéptido BASB201 de cualquier secuencia de la SEC del Grupo 2, en la que varios, unos pocos, de 5 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2, 1 o ningún residuo aminoácido se ha sustituido, modificado, eliminado y/o añadido, en cualquier combinación. Especialmente preferidas entre éstas son las sustituciones, adiciones y deleciones silenciosas, que no alteran las propiedades y actividades del polipéptido BASB201.

Formas de realización preferidas son los polinucleótidos que codifican polipéptidos que conservan sustancialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido maduro codificado por una secuencia de ADN seleccionada de la SEC del Grupo 1.

20 También se describen polinucleótidos que se hibridan, particularmente en condiciones rigurosas, con secuencias de polinucleótidos BASB201, tales como los polinucleótidos de la SEC del Grupo 1.

25 También se describen polinucleótidos que hibridan con las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento. A este respecto, se describen polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con las secuencias de polinucleótidos descritos en el presente documento. Como se usan en el presente documento, las expresiones "condiciones rigurosas" y "condiciones de hibridación rigurosas" quieren decir que la hibridación se produce sólo si hay al menos una identidad del 95% y preferentemente al menos una identidad del 97% entre las secuencias. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación rigurosas es la incubación durante toda la noche a 42 °C en una solución que comprende: 50% de formamida, 5x SSC (NaCl 154 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, seguido de lavado del soporte de hibridación en 0,1 x SSC a aproximadamente 65 °C. Las condiciones de hibridación y de lavado son muy conocidas y se encuentran ejemplos en Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), particularmente en su capítulo 11. También se puede usar la hibridación en solución con las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la invención.

35 También se describe un polinucleótido constituido por o que comprende una secuencia de polinucleótidos obtenida mediante selección en una biblioteca apropiada que contiene el gen completo para una secuencia de polinucleótidos expuesta en cualquiera de las secuencias de la SEC del Grupo 1 en condiciones de hibridación rigurosas con una sonda que tiene la secuencia de dicha secuencia de polinucleótidos expuesta en la secuencia correspondiente de la SEC del Grupo 1 o un fragmento de la misma; y el aislamiento de dicha secuencia de polinucleótidos. Los fragmentos útiles para la obtención de dicho polinucleótido incluyen, por ejemplo, sondas y cebadores ampliamente descritos en otras partes del presente documento.

40 Como se trata en otras partes del presente documento en lo que respecta a ensayos con polinucleótidos de la invención, por ejemplo, los polinucleótidos de la invención se pueden usar como sondas de hibridación para ARN, ADNc y ADN genómico para aislar ADNc de longitud completa y clones genómicos que codifican BASB201 y para aislar ADNc y clones genómicos de otros genes que presentan una identidad elevada, particularmente una elevada identidad de secuencia, con el gen BASB201. Dichas sondas generalmente comprenderán al menos 15 residuos nucleótidos o pares de bases. Preferentemente, dichas sondas tendrán al menos 30 residuos nucleótidos o pares de bases y pueden tener al menos 50 residuos nucleótidos o pares de bases. Sondas particularmente preferidas tendrán al menos 20 residuos nucleótidos o pares de bases y tendrán menos de 30 residuos nucleótidos o pares de bases.

50 Una región codificadora de un gen BASB201 se puede aislar mediante selección usando una secuencia de ADN proporcionada en la SEC del Grupo 1 para sintetizar una sonda oligonucleotídica. Después se usa un oligonucleótido marcado que tiene una secuencia complementaria a la de un gen de la invención para seleccionar en una biblioteca de ADNc, ADN genómico o ARNm, para determinar con qué miembros de la biblioteca se hibrida la sonda.

55 Existen varios procedimientos disponibles y muy conocidos por los expertos en la técnica para obtener ADN de longitud completa o extender ADN cortos, por ejemplo, los basados en los procedimientos de amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE) (véase, por ejemplo, Frohman, y col., PNAS USA 85 8998-9002, 1988). Modificaciones recientes de la técnica, ejemplificadas por la tecnología Marathon™ (Clontech Laboratories Inc.), por

ejemplo, han simplificado significativamente la búsqueda de ADNc más largos. En la tecnología Marathon™, se preparan ADNc a partir de ARNm extraído de un tejido seleccionado y se liga en cada extremo una secuencia "adaptadora". A continuación se lleva a cabo la amplificación de los ácidos nucleicos (PCR) para amplificar el extremo 5' "que falta" del ADN usando una combinación de cebadores de oligonucleótidos específicos del gen y específicos del adaptador. Después se repite la reacción PCR usando cebadores "anidados", es decir, cebadores diseñados para hibridarse en el producto amplificado (normalmente un cebador específico del adaptador que se hibrida más allá de 3' en la secuencia adaptadora y un cebador específico del gen que se hibrida más allá de 5' en la secuencia del gen seleccionado). Después, los productos de esta reacción se pueden analizar mediante secuenciación del ADN y se puede construir un ADN de longitud completa uniendo directamente el producto al ADN existente para dar una secuencia completa o llevando a cabo una PCR de longitud completa separada usando la nueva información de la secuencia para el diseño del cebador 5'.

Los polinucleótidos y polipéptidos útiles de la invención se pueden emplear, por ejemplo, como reactivos y materiales de investigación para el descubrimiento de tratamientos y diagnóstico de enfermedades, particularmente en enfermedades humanas, como se describe en profundidad en el presente documento en relación con ensayos con polinucleótidos.

Los polinucleótidos de la invención que son oligonucleótidos derivados de una secuencia de la SEC del Grupo 1 se pueden usar como se ha descrito en los procedimientos del presente documento, pero, preferentemente, se usan para la PCR, con el fin de determinar si los polinucleótidos identificados en el presente documento se transcriben, o no, completamente o en parte, en bacterias en tejido infectado. Se reconoce que dichas secuencias también tendrán utilidad en el diagnóstico de la fase de infección y del tipo de infección que ha alcanzado el patógeno.

La invención también proporciona polinucleótidos que codifican un polipéptido que es la proteína madura más aminoácidos amino o carboxilo-terminales adicionales, o aminoácidos interiores del polipéptido maduro (cuando la forma madura tiene más de una cadena polipeptídica, por ejemplo). Dichas secuencias pueden desempeñar un papel en el procesamiento de una proteína a partir de un precursor hasta una forma madura, pueden permitir el transporte de la proteína, pueden alargar o acortar la semivida de la proteína o pueden facilitar la manipulación de la proteína para un ensayo o su producción, entre otras cosas. Como normalmente es el caso *in vivo*, los aminoácidos adicionales se pueden procesar aparte de la proteína madura mediante enzimas celulares.

Para todos y cada uno de los polinucleótidos de la invención se proporciona un polinucleótido complementario a él. Se prefiere que estos polinucleótidos complementarios sean completamente complementarios a cada polinucleótido con el que son complementarios.

Una proteína precursora, que tiene una forma madura del polipéptido fusionado a una o más prosecuencias puede ser una forma inactiva del polipéptido. Cuando las prosecuencias se eliminan, generalmente dichos precursores inactivos se activan. Algunas o todas las prosecuencias se pueden eliminar antes de la activación. Generalmente, dichos precursores se denominan proproteínas.

Además de las representaciones habituales A, G, C, T/U para los nucleótidos, también se puede usar el término "N" en la descripción de ciertos polinucleótidos de la invención. "N" significa que en esa posición designada en la secuencia de ADN o ARN puede aparecer cualquiera de los cuatro nucleótidos de ADN o ARN, excepto que se prefiere que N no sea un ácido nucleico que cuando se toma en combinación con posiciones de nucleótidos adyacentes, cuando se lee en el marco de lectura correcto, tiene el efecto de generar un codón de terminación prematura en dicho marco de lectura. En resumen, un polinucleótido de la invención puede codificar una proteína madura, una proteína madura más una secuencia líder (que se puede denominar preproteína), un precursor de una proteína madura que tenga una o más prosecuencias que no son las secuencias líder de una preproteína, o una preproteína, que es una precursora de una proproteína, que tiene una secuencia líder y una o más prosecuencias, que generalmente se eliminan durante las etapas de procesamiento que producen formas activas y maduras del polipéptido.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona el uso de un polinucleótido de la invención para fines terapéuticos o profilácticos, en particular para inmunización genética.

El uso de un polinucleótido de la invención en la inmunización genética empleará, preferentemente, un procedimiento de liberación adecuado, tal como inyección directa de ADN plasmídico en los músculos (Wolf y col. Hum Mol Genet (1992) 1: 363, Manthorpe y col., Hum. Gene Ther. (1983) 4: 419), liberación de ADN en complejo con proteínas transportadoras específicas (Wu y col., J Biol Chem. (1989) 264: 16985), coprecipitación de ADN con fosfato cálcico (Benvenisty & Reshef, PNAS USA, (1986) 83: 9551), encapsulación de ADN en varias formas de liposomas (Kaneda y col., Science (1989) 243: 375), bombardeo de partículas (Tang y col., Nature (1992) 356:152, Eisenbraun y col., DNA Cell Biol (1993) 12: 791) e infección *in vivo* usando vectores retrovirales clonados (Seeger y col., PNAS USA (1984) 81: 5849).

### **Vectores, células hospedadoras, sistemas de expresión**

La invención también se refiere a vectores que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos de la invención, a células hospedadoras que están manipuladas genéticamente con vectores y a la producción de polipéptidos de la

invención mediante técnicas recombinantes. También se pueden emplear sistemas de traducción acelulares para producir dichas proteínas usando ARN derivados de las construcciones de ADN de la invención.

Los polipéptidos recombinantes de la presente invención se pueden preparar mediante procedimientos muy conocidos por los expertos en la técnica, a partir de células hospedadoras manipuladas genéticamente que comprenden sistemas de expresión. De acuerdo con esto, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a sistemas de expresión que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos de la presente invención, a células hospedadoras que están manipuladas genéticamente con dichos sistemas de expresión y a la producción de polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes.

Para la producción recombinante de los polipéptidos de la invención, las células hospedadoras se pueden manipular genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos o polinucleótidos de la invención. La introducción de un polinucleótido en la célula hospedadora se puede llevar a cabo mediante procedimientos descritos en muchos manuales de laboratorio de referencia, tales como Davis, y col., BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, (1986) y Sambrook, y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), tales como, transfección con fosfato cálcico, transfección mediada con DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada con lípidos catiónicos, electroporación, conjugación, transducción, carga por raspado, introducción balística e infección.

Ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen células bacterianas tales como células de estreptococos, estafilococos, enterococos, *E. coli*, *Streptomyces*, cianobacterias, *Bacillus subtilis*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*; células de hongos, tales como células de una levadura, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Pichia*, un basidiomiceto, *Candida albicans* y *Aspergillus*; células de insecto tales como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1 y células de melanoma de Bowes; y células de plantas, tales como células de una gimnosperma o de una angiosperma.

Para producir los polipéptidos de la invención se puede usar una gran variedad de sistemas de expresión. Esos vectores incluyen, entre otros, vectores derivados de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, papovavirus, tal como SV40, virus de la viruela, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus pseudorrábicos, picomavirus, retrovirus, y alfavirus y vectores derivados de sus combinaciones, tales como aquellos derivados de plásmidos y elementos genéticos de bacteriófagos, tales como cósmidos y fagemidos. Las construcciones de sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulan y generan la expresión. Generalmente, para la expresión en este sentido se puede usar cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o expresar un polipéptido en un hospedador. La secuencia de ADN apropiada se puede insertar en el sistema de expresión mediante cualquiera de una variedad de técnicas rutinarias muy conocidas, tales como, por ejemplo, aquellas expuestas en Sambrook y col., MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL, (ant.).

En sistemas de expresión recombinantes en eucariotas, para la secreción de una proteína traducida en el lumen del retículo endoplasmático, en el espacio periplasmático o en el entorno extracelular se pueden incorporar señales de secreción apropiadas en el polipéptido expresado. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden recuperar y purificar de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos muy conocidos, que incluyen precipitación con sulfato amónico 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 de lectina. . Más preferentemente, para la purificación se emplea la cromatografía de afinidad con ion-metal (IMAC). Se pueden emplear técnicas muy conocidas para replegar proteínas para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante la síntesis intracelular, el aislamiento y/o la purificación.

El sistema de expresión también puede ser un microorganismo vivo recombinante, tal como un virus o una bacteria. El gen de interés se puede insertar en el genoma de un virus o bacteria vivo recombinante. La inoculación y la infección *in vivo* con este vector vivo darán lugar a la expresión *in vivo* del antígeno y a la inducción de respuestas inmunitarias. Los virus y bacterias usados para este fin son, por ejemplo: poxvirus (p. ej., variolavirus, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario, alfavirus (virus de Sindbis, virus del Semliki Forest, virus de la encefalitis equina venezolana), adenovirus, virus asociados a adenovirus, picornavirus (poliovirus, rinovirus), herpesvirus (virus de la varicela zóster etc.), *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, BCG, estreptococos. Estos virus y bacterias pueden ser virulentos o pueden atenuarse de diversos modos para obtener vacunas con microorganismos vivos. Dichas vacunas con microorganismos vivos también forman parte de la invención.

#### **Ensayos diagnósticos, pronósticos, serotipado y de mutación**

La presente invención también se refiere al uso de polinucleótidos y polipéptidos BASB201 de la invención para su uso como reactivos diagnósticos. La detección de polinucleótidos y/o polipéptidos BASB201 en un eucariota,

particularmente un mamífero, y especialmente un ser humano, proporcionará un procedimiento diagnóstico para el diagnóstico de la enfermedad, de la fase de la enfermedad o la respuesta de un organismo infeccioso a fármacos. Los eucariotas, particularmente mamíferos, y especialmente seres humanos, particularmente aquellos infectados o que se sospecha que están infectados con un organismo que comprende un gen o proteína BASB201, se pueden detectar a nivel de los ácidos nucleicos o de los aminoácidos mediante una variedad de técnicas muy conocidas, así como mediante procedimientos proporcionados en el presente documento.

Los polipéptidos y polinucleótidos para el pronóstico, diagnóstico u otro análisis se pueden obtener a partir de materiales corporales infectados putativamente y/o de individuos infectados. Los polinucleótidos procedentes de cualquiera de estas fuentes, particularmente el ADN o el ARN, se pueden usar directamente para la detección o se pueden amplificar enzimáticamente mediante el uso de PCR o cualquier otra técnica de amplificación antes del análisis. También se pueden usar ARN, particularmente ARNm, ADNc, y ADN genómico de la misma forma. Usando la amplificación se puede llevar a cabo la caracterización de la especie y la cepa del organismo infeccioso o residente presente en un individuo, mediante un análisis del genotipo de un polinucleótido seleccionado del organismo. Las deleciones e inserciones se pueden detectar por un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con un genotipo de una secuencia de referencia seleccionada procedente de un organismo relacionado, preferentemente una especie diferente del mismo género o una cepa diferente de la misma especie. Las mutaciones puntuales se pueden identificar hibridando el ADN amplificado a secuencias de polinucleótidos BASB201 marcadas. Las secuencias perfecta o significativamente apareadas se pueden distinguir de los dúplex apareados de manera imperfecta o más significativamente desapareados mediante digestión con ADNasa o PNasa, para el ADN o el ARN respectivamente, o detectando diferencias en las temperaturas de fusión o en las cinéticas de renaturalización. Las diferencias en la secuencia de polinucleótidos también se pueden detectar mediante alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos de polinucleótidos en geles comparada con una secuencia de referencia. Esto se puede llevar a cabo con o sin agentes desnaturizantes. Las diferencias en los polinucleótidos también se pueden detectar por secuenciación directa del ADN o el ARN. Véase, por ejemplo, Myers et al., Science, 230: 1242 (1985). Los cambios de secuencia en localizaciones específicas también se pueden revelar mediante ensayos de protección de nucleasas, tales como el ensayo de protección de la ARNasa V1 y S1 o un procedimiento de escisión química. Véase, por ejemplo, Cotton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4397-4401 (1985).

En otra forma de realización se puede construir una matriz de sondas de oligonucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos BASB201 o fragmentos de la misma para realizar una selección eficiente de, por ejemplo, mutaciones genéticas, serotipo, clasificación taxonómica o identificación. Los procedimientos de la tecnología con matrices son muy conocidos, tienen aplicabilidad general y se pueden usar para abordar una variedad de cuestiones en genética molecular, incluyendo la expresión de genes, la unión genética y la variabilidad genética (véase, por ejemplo, Chee y col., Science, 274: 610 (1996)).

Se describe un kit diagnóstico que comprende:

- (a) un polinucleótido de la presente invención, preferentemente cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la SEC del Grupo 1 o un fragmento de la misma;
- (b) una secuencia de nucleótidos complementaria a la de (a);
- (c) un polipéptido de la presente invención, preferentemente cualquiera de los polipéptidos de la SEC del Grupo 2 o un fragmento de los mismos; o
- (d) un anticuerpo contra a un polipéptido de la presente invención, preferentemente a cualquiera de los polipéptidos de la SEC del Grupo 2.

Se apreciará que en cualquiera de estos kit, (a), (b), (c) o (d) pueden comprender un componente sustancial. Dicho kit será útil en el diagnóstico de una enfermedad o la susceptibilidad a una enfermedad, entre otras cosas.

Se describe el uso de polinucleótidos de la presente invención como reactivos diagnósticos. La detección de una forma mutada de un polinucleótido de la invención, preferentemente, cualquier secuencia de la SEC del Grupo 1 que está asociada con una enfermedad o patogenicidad proporcionará una herramienta diagnóstica que se puede añadir a, o puede definir, un diagnóstico de una enfermedad, un pronóstico de la evolución de una enfermedad, una determinación de una fase de la enfermedad o una susceptibilidad a una enfermedad, que resulta de la subexpresión, sobreexpresión o expresión alterada del polinucleótido. Los organismos, particularmente organismos infecciosos, que portan mutaciones en dicho polinucleótido se pueden detectar a nivel del polinucleótido mediante una variedad de técnicas, tales como las descritas en otros partes del presente documento.

Las células de un organismo portador de mutaciones o polimorfismos (variaciones alélicas) en un polinucleótido y/o polipéptido de la invención también se pueden detectar a nivel de los polinucleótido o de los polipéptidos mediante una variedad de técnicas, para permitir, por ejemplo, el serotipado. Por ejemplo, se puede usar RT-PCR para detectar mutaciones en el ARN. Es particularmente preferido usar RT-PCR junto con sistemas de detección automatizados, tales como, por ejemplo, GeneScan. También se puede usar ARN, ADNc o ADN genómico para el mismo fin, PCR. Como ejemplo, se pueden usar cebadores de PCR complementarios a un polinucleótido que codifica el polipéptido BASB201 para identificar y analizar mutaciones.

También se describen cebadores con 1, 2, 3 o 4 nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o del extremo 3'. Estos cebadores se pueden usar para, entre otras cosas, amplificar ADN y/o ARN de BASB201 aislado a partir de una muestra derivada de un individuo, tal como un material corporal. Los cebadores se pueden usar para amplificar un polinucleótido aislado procedente de un individuo infectado, de manera que el polinucleótido se pueda someter a continuación a diversas técnicas para la dilucidación de la secuencia de polinucleótidos. De esta forma, se pueden detectar las mutaciones en la secuencia de polinucleótidos y se pueden usar para diagnosticar y/o pronosticar la infección o su fase o su evolución, o para realizar el serotipo y/o clasificar el agente infeccioso.

La invención además proporciona un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad, preferentemente infecciones bacterianas, más preferentemente infecciones provocadas por *H. influenzae* no tipificable, que comprende la determinación a partir de una muestra procedente de un individuo, tal como un material corporal, de un nivel de expresión incrementado del polinucleótido que tiene una secuencia de cualquiera de las secuencias de la SEC del Grupo 1. La expresión incrementada o reducida de un polinucleótido BASB201 se puede medir usando cualquiera de los procedimientos muy conocidos en la técnica para la cuantificación de polinucleótidos tales como, por ejemplo, amplificación, PCR, RT-PCR, protección de ARNasa, transferencia de tipo Northern, espectrometría y otros procedimientos de hibridación.

Además, se puede usar un ensayo diagnóstico de acuerdo con la invención para la detección de la sobreexpresión de un polipéptido BASB201 comparada con muestras de tejido control normal para, por ejemplo, detectar la presencia de una infección. Las técnicas de ensayo que se pueden usar para determinar los niveles de un polipéptido BASB201 en una muestra procedente de un hospedador, tal como un material corporal, son muy conocidas por los expertos en la técnica. Dichos procedimientos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de transferencia tipo Western, ensayos tipo sándwich con anticuerpos, detección de anticuerpos y ensayos de ELISA.

Los polinucleótidos de la invención se pueden usar como componentes de matrices de polinucleótidos, preferentemente matrices o redes de alta densidad. Estas matrices de alta densidad son particularmente útiles para fines diagnósticos y pronósticos. Por ejemplo, se puede usar para el ensayo con sondas un grupo de puntos, comprendiendo cada uno un gen diferente y adicionalmente un polinucleótido o polinucleótidos de la invención, tal como el uso de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos, usando una sonda obtenida o derivada de una muestra corporal, para determinar la presencia de una secuencia de polinucleótidos concreta o una secuencia relacionada en un individuo. Dicha presencia puede indicar la presencia de un patógeno, particularmente *H. influenzae* no tipificable, y puede ser útil en el diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad o de la evolución de una enfermedad. Se prefiere una red que comprende una serie de variantes de cualquier secuencia de polinucleótidos de la SEC del Grupo 1. También se prefiere una serie de variantes de una secuencia de polinucleótidos que codifica cualquier secuencia de polipéptidos de la SEC del Grupo 2.

### **Anticuerpos**

Los polipéptidos y polinucleótidos de la invención o variantes de los mismos o células que los expresan se pueden usar como inmunógenos para producir anticuerpos inmuno-específicos para dichos polipéptidos o polinucleótidos, respectivamente. Como alternativa, también se pueden usar mimótopos, particularmente mimótopos peptídicos, de epítomos dentro de la secuencia de polipéptidos, como inmunógenos para producir anticuerpos inmuno-específicos para el polipéptido de la invención. El término "inmuno-específico" significa que los anticuerpos tienen sustancialmente mayor afinidad por los polipéptidos de la invención que su afinidad por otros polipéptidos relacionados de la técnica anterior.

En ciertas formas de realización preferidas de la invención se proporcionan anticuerpos contra polipéptidos o polinucleótidos BASB201.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos o polinucleótidos de la invención se pueden obtener administrando los polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención o fragmentos portadores de epítomos de cualquiera de los dos o de ambos, análogos de cualquiera de los dos o de ambos, o células que expresan cualquiera de los dos o ambos, a un animal, preferentemente no humano, usando protocolos rutinarios. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica conocida en la materia que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos de líneas celulares continuas. Ejemplos incluyen diversas técnicas, tales como las indicadas en Kohler, G. y Milstein, C., *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor y col., *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole y col., pg. 77-96 en *MONOCLONAL ANTI-BODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc. (1985).

Se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de EE.UU. N° 4.946.778) para producir anticuerpos de cadena sencilla frente a polipéptidos o polinucleótidos de la presente invención. Asimismo, se pueden usar ratones transgénicos, u otros organismos o animales, tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados inmuno-específicos frente a los polipéptidos o polinucleótidos de la invención.

Como alternativa, se puede usar la tecnología de presentación en fagos para seleccionar genes de anticuerpos con actividades de unión hacia un polipéptido de la invención a partir de repertorios de genes v amplificados por PCR de linfocitos procedentes de seres humanos seleccionados según la presencia de anti-BASB118 o de bibliotecas

intactas (McCafferty, y col., (1990), Nature 348, 552-554; Marks, y col., (1992) Biotechnology 10, 779-783). La afinidad de estos anticuerpos también se puede mejorar mediante, por ejemplo, intercambio de cadenas (Clackson y col., (1991) Nature 352: 628).

5 Los anticuerpos descritos anteriormente se pueden emplear para aislar o identificar clones que expresan los polipéptidos o polinucleótidos de la invención para purificar los polipéptidos o polinucleótidos mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad.

Así, se pueden emplear, entre otros, anticuerpos contra el polipéptido BASB201 o el polinucleótido BASB201 para tratar infecciones, particularmente infecciones bacterianas.

10 Las variantes polipeptídicas que incluyen variantes antigénica, epitópica o inmunológicamente equivalentes forman un aspecto concreto de la presente invención.

15 Preferentemente, el anticuerpo o una variante del mismo se modifica para hacerlo menos inmunogénico en el individuo. Por ejemplo, si el individuo es un ser humano, el anticuerpo puede estar, lo más preferentemente, "humanizado", en el que la región o regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo derivado del hibridoma se ha transplantado a un anticuerpo monoclonal humano, como se describe en, por ejemplo, Jones y col. (1986), Nature 321, 522-525 o Tempest y col., (1991) Biotechnology 9, 266-273.

### **Antagonistas y agonistas - Ensayos y moléculas**

20 Los polipéptidos y polinucleótidos de la invención también se pueden usar para valorar la unión de sustratos y ligandos de molécula pequeña en, por ejemplo, células, preparaciones acelulares, bibliotecas químicas y mezclas de productos naturales. Estos sustratos y ligandos pueden ser sustratos y ligandos naturales o pueden ser miméticos estructurales o funcionales. Véase, por ejemplo, Coligan y col., Current Protocols in Immunology 1(2): Capítulo 5 (1991).

25 Los procedimientos de selección pueden medir simplemente la unión de un compuesto candidato al polipéptido o polinucleótido, o a células o membranas que llevan el polipéptido o polinucleótido, o una proteína de fusión del polipéptido por medio de un marcador directa o indirectamente asociado con el compuesto candidato. Como alternativa, el procedimiento de selección puede implicar la competición con un competidor marcado. Además, estos procedimientos de selección pueden someter a ensayo si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por activación o inhibición del polipéptido o polinucleótido, usando sistemas de detección apropiados para las células que comprenden el polipéptido o polinucleótido. Los inhibidores de la activación generalmente se someten a ensayo en presencia de un agonista conocido y se observa el efecto sobre la activación por el agonista mediante la presencia del compuesto candidato. Se pueden emplear polipéptidos constitutivamente activos y/o polipéptidos y polinucleótidos expresados constitutivamente en los procedimientos de selección de agonistas inversos o inhibidores en ausencia de un agonista o un inhibidor, sometiendo a ensayo si el compuesto candidato da como resultado la inhibición de la activación del polipéptido o polinucleótido según sea el caso. Además, los procedimientos de selección pueden comprender simplemente las etapas de mezcla de un compuesto candidato con una solución que contiene un polipéptido o polinucleótido de la presente invención, para formar una mezcla, midiendo la actividad del polipéptido y/o polinucleótido BASB201 en la mezcla y comparando la actividad del polipéptido y/o polinucleótido BASB201 de la mezcla con un patrón. Las proteínas de fusión, tales como las preparadas a partir de la porción Fc y el polipéptido BASB201, como se ha descrito anteriormente, también se pueden usar para ensayos de selección de alto rendimiento para identificar antagonistas del polipéptido de la presente invención, así como de polipéptidos filogenética y/o funcionalmente relacionados (véase D. Bennett y col., J Mol Recognition, 8:52-58 (1995); y K. Johanson y col., J Biol Chem. 270(16):949-9471 (1995)).

45 Los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos que se unen a y/o interaccionan con un polipéptido de la presente invención también se pueden usar para configurar procedimientos de selección para detectar el efecto de compuestos añadidos sobre la producción de ARNm y/o del polipéptido en células. Por ejemplo, se puede construir un ensayo ELISA para medir los niveles de polipéptido secretados o asociados con la célula usando anticuerpos monoclonales y policlonales mediante procedimientos habituales conocidos en la técnica. Esto se puede usar para descubrir agentes que puedan inhibir o aumentar la producción de polipéptido (también denominados antagonistas o agonistas, respectivamente) a partir de células o tejidos convenientemente manipulados.

50 Se describe un procedimiento de selección de compuestos para identificar aquellos que aumentan (agonistas) o bloquean (antagonistas) la acción de los polipéptidos o polinucleótidos BASB201, particularmente los compuestos que son bacteriostáticos y/o bactericidas. El procedimiento de selección puede involucrar técnicas de alto rendimiento. Por ejemplo, para seleccionar agonistas o antagonistas, una mezcla de reacción sintética, un compartimento celular, tal como una membrana, envuelta celular o pared celular, o una preparación de cualquiera de ellos, que comprende el polipéptido BASB201 y un sustrato o ligando marcado de dicho polipéptido se incubaba en ausencia o en presencia de una molécula candidato que puede ser un agonista o antagonista de BASB201. La capacidad de la molécula candidato para agonizar o antagonizar el polipéptido BASB201 se refleja en la unión reducida del ligando marcado o la producción reducida de producto a partir de dicho sustrato. Probablemente, las moléculas que se unen gratuitamente, es decir, sin inducir los efectos del polipéptido BASB201 sean buenos

antagonistas. Las moléculas que se unen bien y, según sea el caso, incrementan la tasa de producción del producto a partir del sustrato, incrementan la transducción de señales, o incrementan la actividad de los canales químicos son agonistas. La detección de la tasa o nivel de, según sea el caso, producción de producto a partir de sustrato, transducción de señales, o actividad de los canales químicos, se puede mejorar usando un sistema informador. Los sistemas informadores que pueden ser útiles a este respecto incluyen, entre otros, sistemas colorimétricos, sustratos marcados convertidos en producto, un gen informador que sea sensible a cambios en la actividad del polinucleótido o polipéptido BASB201, y ensayos de unión conocidos en la técnica.

Otro ejemplo de un ensayo para agonistas de BASB201 es un ensayo competitivo que combina BASB201 y un agonista potencial con moléculas de unión a BASB201, moléculas que se unen a BASB201 recombinante, sustratos o ligandos naturales, o miméticos de sustratos o ligandos, en condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. BABS021 se puede marcar, tal como mediante radiactividad o un compuesto colorimétrico, de manera que el número de moléculas de BABS201 unidas a una molécula de unión o convertidas en producto se puede determinar exactamente para valorar la eficacia del antagonista potencial.

Los antagonistas potenciales incluyen, entre otros, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, polipéptidos y anticuerpos que se unen a un polinucleótido y/o polipéptido de la invención y, por tanto, inhiben o suprimen su actividad o expresión. Los antagonistas potenciales también pueden ser pequeñas moléculas orgánicas, un péptido, un polipéptido tal como una proteína o anticuerpo estrechamente relacionados o que se unen a los mismos sitios en una molécula de unión, tal como una molécula de unión, sin inducir actividades inducidas por BABS201, evitando de este modo la acción expresión de polinucleótidos y/o polipéptidos BABS201 mediante la exclusión de la unión de los polinucleótidos y/o polipéptidos BABS201.

Los antagonistas potenciales incluyen una molécula pequeña que se una y ocupe el sitio de unión del polipéptido, de modo que evite la unión a moléculas de unión celular, de manera que se impida la actividad biológica normal. Ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, entre otras, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos o moléculas similares a péptidos. Otros antagonistas potenciales incluyen moléculas antisentido (véase J. Neurochem. 56:560 (1991); OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION, CRC Press, Boca Raton, FL (1988), una descripción de estas moléculas). Los antagonistas

También se describen proteínas de fusión solubles modificadas genéticamente que comprenden un polipéptido de la presente invención, o un fragmento del mismo, y diversas porciones de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de varias subclases (IgG, IgM, IgA, IgE). Como inmunoglobulina preferida está la parte constante de la cadena pesada de la IgG humana, particularmente la IgG1, en la que la fusión tiene lugar en la región bisagra. En una forma de realización particular, la parte Fc se puede eliminar simplemente con la incorporación de una secuencia de escisión que se puede escindir con el factor de coagulación sanguíneo Xa. También se describen procedimientos para la preparación de estas proteínas de fusión mediante ingeniería genética y a su uso para la selección de fármacos, diagnóstico y terapia. Un aspecto adicional de la invención también se refiere a polinucleótidos que codifican esas proteínas de fusión. Ejemplos de tecnología para proteínas de fusión se pueden encontrar en las Solicitudes de patente internacional N° WO94/29458 y WO94/22914.

Cada una de las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento se puede usar en el descubrimiento y desarrollo de compuestos antibacterianos. La proteína codificada, tras expresión, se puede usar como una diana para la selección de fármacos antibacterianos. De manera adicional, las secuencias de polinucleótidos que codifican las regiones amino terminales de la proteína codificada o de Shine-Delgarno u otra traducción que facilita las secuencias del ARNm respectivo se pueden usar para construir secuencias antisentido para controlar la expresión de la secuencia codificadora de interés.

La invención también proporciona el uso del polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista de la invención con la interacción física inicial entre un patógeno o patógenos y un hospedador eucariótico, preferentemente mamífero, responsable de secuelas de la infección. En particular, las moléculas de la invención se pueden usar: en la prevención de la adhesión de bacterias, en particular bacterias grampositivas y/o gramnegativas, a las proteínas de la matriz extracelular de eucarióticos, preferentemente de mamíferos, o en dispositivos permanentes o a proteínas de la matriz extracelular en heridas; para bloquear la adhesión bacteriana entre proteínas de la matriz extracelular entre eucarióticos, preferentemente mamíferos, y proteínas BABS201 bacterianas que median en el daño tisular y/o bloquear la progresión normal de la patogenia en las infecciones iniciadas distintas de la implantación de dispositivos permanentes o mediante otras técnicas quirúrgicas..

También se describen agonistas y antagonistas de BASB201, preferentemente, agonistas y antagonistas bacteriostáticos o bactericidas.

Los antagonistas y agonistas se pueden emplear para, por ejemplo, evitar, inhibir y/o tratar enfermedades.

También se describen mimótopos del polipéptido de la invención. Un mimótopo es una secuencia peptídica, suficientemente similar al péptido nativo (secuencial o estructuralmente), que es capaz de ser reconocida por anticuerpos que reconocen el péptido nativo o que es capaz de producir anticuerpos que reconocen el péptido nativo cuando está acoplado a un vehículo adecuado.

Los mimótopos de péptidos se pueden diseñar para un propósito concreto mediante adición, supresión o sustitución de aminoácidos elegidos. De este modo, los péptidos se pueden modificar para los fines de fácil conjugación a un vehículo proteico. Por ejemplo, puede ser deseable para algunos procedimientos de conjugación química incluir una cisteína terminal. Además puede ser deseable para péptidos conjugados a un vehículo proteico incluir un extremo hidrófobo distal con respecto al extremo conjugado del péptido, de manera que el extremo no conjugado libre del péptido permanece asociado con la superficie de la proteína del vehículo. De este modo se presenta el péptido en una conformación que se parece muy estrechamente a la del péptido encontrado en el contexto de la molécula entera nativa. Por ejemplo, los péptidos se pueden alterar para que tengan una cisteína en N-terminal y una cola amidada hidrófoba en C-terminal. Como alternativa, se puede realizar adición o sustitución de una forma de diastereómero D de uno o más de los aminoácidos (secuencias inversas) para crear un derivado beneficioso, por ejemplo para potenciar la estabilidad del péptido. Los mimótopos también pueden ser retrosecuencias de las secuencias peptídicas naturales, es decir la orientación de la secuencia está invertida. Los mimótopos pueden también tener una naturaleza retroinversa. Los péptidos retro, inversos y retroinversos se describen en los documentos WO 95/24916 y WO 94/05311.

Como alternativa, los mimótopos de péptidos se pueden identificar usando anticuerpos que son capaces ellos mismos de unirse a los polipéptidos de la presente invención usando técnicas tales como tecnología de presentación en fagos (documento EP 0 552 267 B1). Esta técnica genera un gran número de secuencias peptídicas que imitan la estructura de los péptidos nativos y son, por tanto, capaces de unirse a anticuerpos peptídicos anti-nativos, pero que no necesariamente comparten una homología de secuencias significativa con el polipéptido nativo.

## **Vacunas**

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunológica en un individuo, particularmente un mamífero, preferentemente seres humanos, que comprende la inoculación del individuo con el polinucleótido y/o polipéptido BASB201, o un fragmento o variante del mismo, adecuado para producir anticuerpos y/o respuesta inmunitaria de linfocitos T para proteger a dicho individuo de la infección, particularmente de la infección bacteriana y, lo más particularmente, la infección por *H. influenzae* no tipificable. También se proporcionan procedimientos en los que tal respuesta inmunológica retrasa la replicación bacteriana. Otro aspecto más de la invención se refiere a un procedimiento de inducción de una respuesta inmunológica en un individuo, que comprende la liberación en dicho de un vector de ácido nucleico, secuencia o ribozima para dirigir la expresión de polinucleótido y/o polipéptido BASN201, o un fragmento o una variante del mismo, in vivo con el fin de inducir una respuesta inmunológica, de manera que produzca anticuerpos y/o respuesta inmunitaria de linfocitos T, incluidas, por ejemplo, linfocitos T productores de citoquinas o linfocitos T citotóxicos, para proteger a dicho individuo, preferentemente un ser humano, de una enfermedad, esté la enfermedad ya establecida en del individuo o no. Un ejemplo de administrar el gen es acelerándolo en las células deseadas como un revestimiento sobre partículas o de otra manera. Tal vector de ácido nucleico puede comprender ADN, ARN, una ribozima, un ácido nucleico modificado, un híbrido de ADN/ARN, un complejo ADN-proteína o un complejo ARN-proteína.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición inmunológica que, cuando se introduce en un individuo, preferentemente un ser humano, capaz de haber inducido en él una respuesta inmunológica, induce una respuesta inmunológica en tal individuo frente a un polinucleótido y/o polipéptido BASB201 codificado a partir de ellos, en la que la composición comprende un polinucleótido y/o polipéptido BASB021 recombinante codificado a partir de ellos y/o comprende ADN y/o ARN que codifica y expresa un antígeno de dicho polinucleótido, polipéptido BASB201 codificado a partir de ellos u otro polipéptido de la invención. La respuesta inmunológica se puede usar terapéuticamente o profilácticamente y puede tomar la forma de inmunidad de anticuerpo y/o inmunidad celular, tal como inmunidad celular producida por los linfocitos T CTL o CD4+.

Un polipéptido BASB201 o un fragmento del mismo se puede condensar con una coproteína o resto químico que puede o no puede producir por él mismo anticuerpos, pero que es capaz de estabilizar la primera proteína y producir una proteína condensada o modificada que tendrá propiedades antigénicas y/o inmunogénicas, y, preferentemente, propiedades protectoras. Por tanto, la proteína recombinante condensada comprende, preferentemente, una coproteína antigénica, tal como la lipoproteína D de *Haemophilus influenzae*, Glutation-S-transferasa (GST) o beta-galactosidasa, o cualquier otra coproteína relativamente grande que solubiliza la proteína y facilita la producción y purificación de la misma. Además, la coproteína puede actuar como un adyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmunitario del organismo que recibe la proteína. La coproteína se puede unir a bien en el terminal amino o en el terminal carboxi de la primera proteína.

En una composición de vacuna de acuerdo con la invención, un polipéptido y/o polinucleótido, o un fragmento o un mimotopo o una variante de los mismos pueden estar presentes en un vector, tal como los vectores recombinantes vivos descritos anteriormente, por ejemplo vectores bacterianos vivos.

También son adecuados los vectores no vivos para el polipéptido BABS201, por ejemplo vesículas de la membrana externa bacteriana o "ampollas". Las ampollas de ME derivan de la membrana externa de la membrana bicapa de las bacterias gramnegativas y se han documentado en muchas bacterias gramnegativas (Zhou, y col. 1998. FEMS Microbiol. Lett. 163:223-228) incluidas *C. trachomatis* y *C. psittaci*. Una lista no minuciosa de patógenos bacterianos de los que se ha informado que producen ampollas también incluye: *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*,



*Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Yersinia enterocolitica*.

Las ampollas tienen la ventaja de proporcionar proteínas de la membrana externa en su conformación nativa y, por tanto, son particularmente útiles para desarrollar vacunas. Asimismo, las ampollas se pueden mejorar para el uso en vacunas mediante manipulación de la bacteria con el fin de modificar la expresión de una o más moléculas en la membrana externa. Por tanto, por ejemplo, se puede introducir o aumentar por incremento la expresión de una proteína inmunogénica deseada en la membrana externa, tal como el polipéptido BASB201 (p. ej., alterando el promotor). En lugar de, o además de, se puede regular por disminución la expresión de moléculas de membrana externa que son no relevantes (p. ej., antígenos no protectores o proteínas inmunodominantes pero variables) o perjudiciales (p. ej., moléculas tóxicas tales como LPS o inductores potenciales de una respuesta autoinmunitaria). Estos abordajes se tratarán más detalladamente más adelante.

Las regiones flanqueantes no codificantes del gen BASB201 contienen elementos reguladores importantes en la expresión del gen. Esta regulación tiene lugar a nivel transcripcional y traduccional. Se puede obtener la secuencia de estas regiones antes o después del marco de lectura abierto del gen mediante secuenciación del ADN. Esta información de la secuencia permite la determinación de los motivos reguladores potenciales como los elementos diferentes del promotor, las secuencias del terminador, los elementos inducibles de la secuencia, los represores, los elementos responsables para la variación de fase, la secuencia Shine-Dalgarno, las regiones con estructura secundaria potencial implicada en la regulación, así como otros tipos de motivos o secuencias reguladoras. Esta secuencia es un aspecto adicional de la invención. Además, la SEC ID N° 9 es la secuencia en 5' de *Haemophilus influenzae* no tipificable (en 5' del codón de iniciación previsto de los genes preferidos), que comprende aproximadamente 1000 pb.

Esta información de la secuencia permite la modulación de la expresión natural del gen de BASB201. Se puede llevar a cabo la regulación por aumento de la expresión del gen alterando el promotor, la secuencia de Shine-Dalgarno, los potenciales elementos del represor o del operador, o cualquiera de los otros elementos implicados. Igualmente, se puede conseguir la regulación por disminución de la expresión mediante tipos similares de modificaciones. Como alternativa, cambiando las secuencias de variación de fase, se puede colocar la expresión del gen bajo el control de la variación de fase o se puede desacoplar de esta regulación. En otro enfoque, se puede colocar la expresión del gen bajo el control de uno o más elementos inducibles que permitan la expresión regulada. Ejemplos de dicha regulación incluyen, entre otros, la inducción mediante cambio de temperatura, la adición de sustratos inductores como carbohidratos seleccionados o sus derivados, oligoelementos, vitaminas, cofactores, iones metálicos, etc.

Dichas modificaciones tal como se han descrito anteriormente se pueden introducir mediante diversos medios diferentes. La modificación de las secuencias implicadas en la expresión del gen se puede llevar a cabo *in vivo* mediante mutagénesis aleatoria seguida de selección del fenotipo deseado. Otro enfoque consiste en aislar la región de interés y modificarla mediante mutagénesis aleatoria o sustitución dirigida a sitio, mutagénesis mediante inserción o delección. La región modificada puede reintroducirse en el genoma bacteriano mediante recombinación homóloga y se puede evaluar el efecto sobre la expresión del gen. En otro abordaje, se puede usar el conocimiento de la secuencia de la región de interés para sustituir o eliminar todas o parte de las secuencias reguladoras naturales. En este caso, se aísla y modifica la región reguladora diana de modo que contenga los elementos reguladores de otro gen, una combinación de elementos reguladores de diferentes genes, una región reguladora sintética o cualquier otra región reguladora, o para eliminar partes seleccionadas de las secuencias reguladoras naturales. Después se pueden reintroducir en la bacteria estas secuencias modificadas mediante la recombinación homóloga en el genoma. Una lista no exhaustiva de promotores preferidos que podrían usarse para la regulación por aumento de la expresión génica incluye los promotores *porA*, *porB*, *lbpB*, *tbpB*, *p110*, *lst*, *hpuAB* de *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae*; *ompCD*, *copB*, *lbpB*, *ompE*, *UspA1*; *UspA2*; *TbpB* de *M. Catarrhalis*; *p1*, *p2*, *p4*, *p5*, *p6*, *lpD*, *tbpB*, *D15*, *Hia*, *Hmw1*, *Hmw2* de *H. influenzae*.

En un ejemplo se puede modular la expresión de un gen intercambiando su promotor con un promotor más fuerte (mediante el aislamiento de la secuencia antes del gen, la modificación *in vitro* de esta secuencia y la reintroducción en el genoma mediante recombinación homóloga). Se puede regular por aumento la expresión en la bacteria, así como en las vesículas despojadas de la membrana externa (o fabricadas) a partir de la bacteria.

En otros ejemplos se pueden usar los abordajes descritos para generar cepas bacterianas recombinantes con características mejoradas para las aplicaciones de vacuna. Estas pueden ser, pero no limitarse a, cepas atenuadas, cepas con mayor expresión de antígenos seleccionados, cepas con genes defectivos (o menor expresión) de los genes que interfieren con la respuesta inmunitaria, cepas con la expresión modulada de las proteínas inmunodominantes, cepas con modulación del desprendimiento de las vesículas de la membrana externa.

Por tanto, también se proporciona en la invención una región en el lado 5' modificada del gen BASB201, en la que la región en 5' modificada contiene un elemento regulador heterólogo que altera el nivel de expresión de la proteína BASB201 localizada en la membrana externa. La región en 5' de acuerdo con este aspecto de la invención incluye la secuencia en 5' del gen BASB201. La región en 5' comienza inmediatamente antes del gen BASB201 y normalmente continúa hasta una posición no superior a aproximadamente 1000 pb antes del gen desde el codón de

iniciación ATG. En el caso de un gen localizado en una secuencia policistrónica (operón), la región en 5' puede iniciarse inmediatamente antes del gen de interés o antes del primer gen en el operón. Preferentemente, una región en 5' modificada de acuerdo con este aspecto de la invención contiene un promotor en una posición entre 500 y 700 pb antes del ATG.

- 5 El uso de las regiones en el lado 5' divulgadas para regular por aumento la expresión del gen BASB201, un procedimiento para conseguir esto mediante recombinación homóloga (por ejemplo, como se describe en el documento WO 01/09350), un vector que comprende la secuencia del lado 5' adecuada para este fin y una célula hospedadora alterada de este modo son, todos ellos, aspectos adicionales de la presente invención.

- 10 Por tanto, la invención proporciona un polipéptido BASB201 en una ampolla bacteriana modificada. La invención proporciona además células huésped modificadas capaces de producir los vectores no vivos de ampollas de membrana. La invención proporciona además vectores de ácido nucleico que comprenden el gen BASB201 que tiene una región en 5' modificada que contiene un elemento regulador heterólogo.

Además, la invención proporciona procedimientos para preparar las células huésped y ampollas bacterianas de acuerdo con la invención.

- 15 La presente invención también proporciona composiciones, particularmente composiciones de vacuna, y procedimientos que comprenden los polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención y secuencias de ADN inmunoestimuladoras, tales como las descritas en Sato, Y. y col., Science 273: 352 (1996).

- 20 Asimismo, la presente invención proporciona procedimientos que usan el polinucleótido descrito o fragmentos concretos del mismo, que se ha mostrado que codifican regiones no variables de las proteínas de la superficie celular bacteriana, en construcciones de polinucleótidos usados en tales experimentos de inmunización genética en modelos animales de infección con *H. influenzae* no tipificable. Tales experimentos serán particularmente útiles para identificar epítopos de proteínas capaces de provocar una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica. Se cree que este abordaje permitirá la preparación posterior de anticuerpos monoclonales de valor concreto, derivados del órgano requerido del animal que resiste con éxito o elimina la infección, para el desarrollo de agentes profilácticos o tratamientos terapéuticos de infección bacteriana, particularmente infección por *H. influenzae* no tipificable, en mamíferos, particularmente seres humanos.

- 25 La invención también incluye una formulación de vacunas que comprende un polipéptido y/o polinucleótido recombinante inmunogénico de la invención junto con un vehículo adecuado, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable. Ya que los polipéptidos y polinucleótidos se pueden degradar en el estómago, cada uno se administra preferentemente por vía parenteral, incluyendo, por ejemplo, la administración que es subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica. Formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, compuestos bacterioestáticos y solutos, que hacen que la formulación sea isotónica con el fluido corporal, preferentemente la sangre, del individuo; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y
- 30 agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiple, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en estado de secado por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril antes de su uso.

- 35 La formulación de vacuna de la invención también puede incluir sistemas de adyuvantes para potenciar la inmunogenicidad de la formulación. Preferentemente, el sistema de adyuvante origina preferentemente una respuesta de tipo TH1.

Una respuesta inmunitaria puede distinguirse ampliamente en dos categorías extremas, siendo respuestas inmunitarias humorales o celulares (que tradicionalmente se caracterizan por mecanismos de protección efectores de anticuerpos y celulares, respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado respuestas de tipo TH1 (respuesta celular) y respuestas inmunitarias de tipo TH2 (respuesta humoral).

- 45 Las respuestas inmunitarias extremas de tipo TH1 se pueden caracterizar por la generación de linfocitos T citotóxicos restringidos por haplotipo específicos de antígeno y respuestas celulares de tipo asesino natural. En ratones, las respuestas de tipo TH1 a menudo se caracterizan por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en el ser humano estas corresponden a los anticuerpos de tipo IgG1. Las respuestas inmunitarias de tipo TH2 se caracterizan por la generación de una amplia gama de isotipos de inmunoglobulina, incluidas en ratones
- 50 IgG1, IgA e IgM.

Se puede considerar que la fuerza impulsora tras el desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunitarias son citocinas. Niveles elevados de citocinas de tipo TH1 tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunitarias celulares al antígeno dado, mientras que niveles elevados de citocinas de tipo TH2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales al antígeno.

- 55 La distinción de respuestas inmunitarias de tipo TH1 y TH2 no es absoluta. En realidad, un individuo soportará una respuesta inmunitaria que se describe como predominantemente TH1 o predominantemente TH2. No obstante, a menudo es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de lo descrito en los clones de linfocitos T

CD4 +ve por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Tradicionalmente, las respuestas de tipo TH1 se asocian con la producción de las citocinas INF- $\gamma$  e IL-2 por parte de los linfocitos T. Otras citocinas a menudo asociadas directamente con la inducción de respuestas inmunitarias de tipo TH1 no son producidas por los linfocitos T, tales como la IL-12. En contraste con ello, las respuestas de tipo TH2 se asocian con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13.

Se sabe que ciertos adyuvantes de vacunas son particularmente adecuados para la estimulación de respuestas de citocinas de tipo TH1 o TH2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del equilibrio TH1:TH2 de la respuesta inmunitaria tras una vacunación o infección incluye la medición directa de la producción de citocinas TH1 o TH2 por parte de los linfocitos T *in vitro* tras la reestipulación con antígeno, y/o la medición de la proporción IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpo específico de antígeno.

Por tanto, un adyuvante de tipo TH1 es uno que, preferentemente, estimula las poblaciones de linfocitos T aisladas para producir niveles elevados de citocinas de tipo TH1 cuando se reestiman con el antígeno *in vitro* y estimula el desarrollo de linfocitos T citotóxicos CD8+ y respuestas de inmunoglobulina específicas de antígeno asociadas con el isotipo de tipo TH1.

Los adyuvantes que son capaces de la estimulación preferencial de la respuesta celular TH1 se describen en las solicitudes de patente internacional N° WO 94/00153 y WO 95/17209.

El monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (3D-MPL) es uno de tales adyuvantes. Éste se conoce por el documento GB 2220211 (Ribi). Químicamente es una mezcla de monofosforil lípido A 3-O-desacilado con 4, 5, o 6 cadenas aciladas y está fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Una forma preferida de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado se divulga en la patente europea 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biological SA).

Presentemente, las partículas de 3D-MPL son suficientemente pequeñas para que se esterilicen mediante filtración a través de una membrana de 0,22 micrones (patente europea número 0 689 454). El 3D-MPL estará presente en el intervalo de 10  $\mu$ g - 100  $\mu$ g, preferentemente 25 - 50  $\mu$ g por dosis, en la que el antígeno estará típicamente presente en un intervalo 2 - 50  $\mu$ g por dosis.

Otro adyuvante preferido comprende QS21, una fracción no tóxica purificada por HPLC derivada de la corteza de *Quillaja Saponaria Molina*. Opcionalmente éste se puede mezclar con monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (3D-MPL), opcionalmente junto con un vehículo.

El procedimiento de producción de QS21 se describe en la patente de Estados Unidos N° 5.057.540.

Las formulaciones de adyuvantes no reactogénicos que contienen QS21 se han descrito previamente (documento WO 96/33739). Se ha demostrado que tales formulaciones que comprenden QS21 y colesterol son adyuvantes estimulantes de TH1 con éxito cuando se formulan junto con un antígeno.

Los adyuvantes adicionales que son estimuladores preferenciales de respuesta de células TH1 incluyen oligonucleótidos inmunomoduladores, por ejemplo secuencias CpG no metiladas como se describe en el documento WO 96/02555.

Las combinaciones de diferentes adyuvantes estimuladores de TH1, tales como las mencionadas en el presente documento anteriormente, también se contempla que proporcionan un adyuvante que es un estimulador preferencial de respuesta de células TH1. Por ejemplo, QS21 se puede formular junto con 3D-MPL. La relación de QS21:3D-MPL típicamente será del orden de 1:10 a 10:1; preferentemente 1:5 a 5:1 y a menudo sustancialmente 1:1. El intervalo preferido para sinergia óptima es 2,5:1 a 1:1 de 3D-MPL:QS21.

Preferentemente un vehículo también está presente en la composición de vacuna de acuerdo con la invención. El vehículo puede ser una emulsión aceite en agua, o una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

Una emulsión de aceite en agua preferida comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, tocoferol alfa y Tween 80. En un aspecto particularmente preferido los antígenos en la composición de vacuna de acuerdo con la invención se combinan con QS21 y 3D-MPL en tal emulsión. Adicionalmente la emulsión de aceite en agua puede contener span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

Típicamente para la administración a seres humanos QS21 y 3D-MPL estarán presentes en una vacuna en el intervalo de 1  $\mu$ g-200  $\mu$ g, tal como 10-100  $\mu$ g, preferentemente 10  $\mu$ g-50  $\mu$ g por dosis. Normalmente, la emulsión de aceite en agua comprenderá de 2 a 10% de escualeno, de 2 a 10% de alfa-tocoferol y de 0,3 a 3% de Tween 80. Preferentemente, la proporción entre escualeno: alfa-tocoferol es igual o inferior a 1, dado que esta proporciona una emulsión más estable. Span 85 también puede estar presente a un nivel de 1%. En algunos casos puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan además un estabilizador.

Las emulsiones de aceite en agua no tóxicas preferentemente contienen un aceite no tóxico, por ejemplo, escualano

o escualeno, por ejemplo Tween 80, en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

Una formulación adyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210.

- 5 La presente invención también proporciona una composición de vacuna polivalente que comprende una formulación de vacuna de la invención en combinación con otros antígenos, en particular antígenos útiles para tratar la otitis media. Tal composición de vacuna polivalente puede incluir un adyuvante inductor de TH-1 como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

10 En una realización preferida, los polipéptidos, fragmentos e inmunógenos de la invención se formulan con uno o más de los siguientes grupos de antígenos: a) uno o más polisacáridos capsulares de neumococos (simples o conjugados con un vehículo proteico); b) uno o más antígenos que pueden proteger a un huésped contra la infección por *M. catarrhalis*; c) uno o más antígenos proteicos que pueden proteger a un huésped contra la infección por *Streptococcus pneumoniae*; d) uno o más antígenos proteicos de *Haemophilus influenzae* no tipificable; e) uno o más antígenos que pueden proteger a un huésped contra la infección por RSV; y f) no o más antígenos que pueden proteger a un huésped contra el virus de la gripe. Se prefieren las combinaciones con los grupos a) y b); b) y c); b), d), y a) y/o c); b), d), e), f), y a) y/o c). Dichas vacunas pueden usarse de forma ventajosa como vacunas globales para la otitis media.

15 Los antígenos de polisacárido capsular de neumococos se seleccionan, preferentemente, de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F (más preferentemente de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F).

20 Antígenos proteicos de neumococos preferidos son las proteínas de neumococos que están expuestas en la superficie externa del neumococo (que pueden ser reconocidas por el sistema inmunológico de un huésped durante al menos parte del ciclo de vida del neumococo) o son proteínas que el neumococo secreta o libera. Más preferentemente, la proteína es una toxina, adhesina, transductor de señal de 2 componentes o lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae*, o fragmentos de los mismos. Proteínas particularmente preferidas incluyen, entre otras: neumolisina (preferentemente destoxificada mediante tratamiento químico o mutación) [Mitchell y col. Nucleic Acids Res. 1990 Jul 11; 18(13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2.", Mitchell y col. Biochim Biophys Acta 1989 Jan 23; 1007 (1): 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties.", documento WO 96/05859 (A. Cyanamid), documento WO 90/06951 (Paton y col.), documento WO 99/03884 (NAVA)]; PspA y variantes de delección transmembrana de la misma (documentos WO 92/14488; WO 99/53940; US 5804193 -Briles y col.); PspC and variantes de delección transmembrana de la misma (documentos WO 99/53940; WO 97/09994 - Briles y col); PsaA y variantes de delección transmembrana de la misma (Berry y Paton, Infect Immun 1996 Dec; 64(12):5255-62 "SECuence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*"); proteínas de unión a la colina neumocócica y variantes de delección transmembrana de las mismas; CbpA y variantes de delección transmembrana de la misma (documentos WO 97/41151; WO 99/51266); Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Infect. Immun. 1996 64:3544); HSP70 (documento WO 96/40928); PcpA (Sánchez-Beato y col. FEMS Microbiol Lett 1998, 164:207-14); proteína de tipo M, solicitud de patente SB nº EP 0837130; y adhesina 18627 (solicitud de patente SB nº EP 0834568). Otros antígenos proteicos de neumococo son los divulgados en el documento WO 98/18931, particularmente los seleccionados en los documentos WO 98/18930 y PCT/US99/30390.

25 Antígenos proteicos de *Moraxella catarrhalis* que se pueden incluir en una vacuna combinada (especialmente para la prevención de la otitis media) son: OMP106 [documento WO 97/41731 (Antex) y documento WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA y/o LbpB [documento WO 98/55606 (PMC)]; TbpA y/o TbpB [documento WO 97/13785 y documento WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, y col. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [documento WO 93/03761 (Universidad de Texas)]; OmpCD; HasR (documento PCT/EP99/03824); PilQ (documento PCT/EP99/03823); OMP85 (documento PCT/EP00/01468); lipo06 (documento GB 9917977.2); lipo10 (documento GB 9918208.1); lipo11 (documento GB 9918302.2); lipo18 (documento GB 9918038.2); P6 (documento PCT/EP99/03038); D15 (documento PCT/EP99/03822); OmplA1 (documento PCT/EP99/06781); Hly3 (documento PCT/EP99/03257); y OmpE.

30 Otros antígenos proteicos de *Haemophilus influenzae* no tipificable preferidos que se pueden incluir en una vacuna combinada (especialmente para la prevención de la otitis media) incluyen: Proteína fimbriada [(documento US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] y de fusiones que comprenden péptidos de la misma [eg LB1(f) fusiones peptídicas; documento US 5843464 (OSU) o documento WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (State University of New York)]; proteína D (documento EP 594610); TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (documento WO 94/12641); P2; y P5 (documento WO 94/26304).

35 Antígenos del virus de la gripe preferidos incluyen virus enteros, vivos o inactivados, virus de la gripe dividido, cultivado en huevos o en células MDCK, o células Vero o virosomas enteros de la gripe (como describe R. Gluck,

Vaccine, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tales como proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas.

Antígenos preferidos del RSV (virus sincitial respiratorio) incluyen la glicoproteína F, la glicoproteína G, la proteína HN o derivados de las mismas.

## 5 **Composiciones, kits y administración**

En un aspecto adicional de la invención se proporcionan composiciones que comprenden un polinucleótido BASB201 y/o un polipéptido BASB201 para la administración a una célula o a un organismo multicelular.

10 La invención también se refiere a composiciones que comprenden polinucleótido y/o un polipéptido descrito en el presente documento. Los polipéptidos y polinucleótidos de la invención se pueden emplear en combinación con un vehículo o vehículos no estériles o estériles para uso con células, tejidos u organismos, tales como un vehículo farmacéutico adecuado para la administración a un individuo. Tales composiciones comprenden, por ejemplo, un aditivo del medio o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido y/o polinucleótido de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos pueden incluir, entre otros, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La formulación debe adaptarse al modo de administración. También se describen envases y kits de diagnóstico y farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes cargados con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención mencionadas anteriormente.

Los polipéptidos, polinucleótidos y otros compuestos de la invención se pueden emplear solos o junto con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos.

20 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de cualquier manera eficaz, conveniente incluyendo, por ejemplo, la administración mediante las vías tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica entre otras.

En terapia o como profiláctico, el agente activo se puede administrar a un individuo en forma de una composición inyectable, por ejemplo en forma de una dispersión acuosa estéril, preferentemente isotónica.

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido y/o polinucleótido, tal como la forma soluble de un polipéptido y/o polinucleótido de la presente invención, péptido agonista o antagonista o un compuesto de molécula pequeña, en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos incluyen, entre otros, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y las combinaciones de los mismos. La invención además se refiere a paquetes y kit farmacéuticos que comprenden uno o más contenedores cargados con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención mencionadas en lo que antecede. Los polipéptidos, polinucleótidos y otros compuestos de la presente invención se pueden emplear solos o junto con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos.

35 La composición se adaptará a la vía de administración, por ejemplo mediante una vía sistémica o una oral. Las formas preferidas de administración sistémica incluyen inyección, típicamente mediante inyección intravenosa. Se pueden usar otras vías de de inyección, tales como subcutánea, intramuscular, o intraperitoneal. Medios alternativos para la administración sistémica incluyen la administración transmucosa o transdérmica que usa penetrantes tales como sales biliares o ácidos fusídicos u otros detergentes. Además, si un polipéptido u otros compuestos de la presente invención se pueden formular en una formulación entérica o una encapsulada, también puede ser posible la administración oral. La administración de estos compuestos también puede ser tópica y/o localizada, en forma de ungüentos, pastas, geles, soluciones, polvos y similares. Para la administración a mamíferos, y particularmente a seres humanos, se espera que el nivel de dosificación diaria del agente activo esté entre 0,01 mg/kg y 10 mg/kg, típicamente aproximadamente 1 mg/kg. El médico, en cualquier caso, determinará la dosificación real que será la más adecuada para un individuo y variará con la edad, peso y respuesta del individuo concreto. Las dosis mencionadas son ejemplos del caso medio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se requieran intervalos de dosis superiores o inferiores y éstos se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

El intervalo de dosificación requerido depende de la elección del péptido, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la afección del sujeto, y el juicio del facultativo responsable. Sin embargo, las dosificaciones adecuadas están en el intervalo de 0,1-100 µg/kg del sujeto.

50 Una composición de vacuna está convenientemente en una forma inyectable. Se pueden emplear adyuvantes convencionales para potenciar la respuesta inmunitaria. Una dosis unitaria adecuada para vacunación es 0,5-5 microgramos/kg de antígeno, y tal dosis se administra preferentemente 1-3 veces y con un intervalo de 1-3 semanas. Con el intervalo de dosis indicado, no se observará ningún efecto toxicológico indicado con los compuestos de la invención que impediría su administración a individuos adecuados.

55 Sin embargo, se esperaran variaciones amplias en la dosificación necesaria, en vista de la diversidad de compuestos disponibles y las eficacias diferentes de diversas vías de administración. Por ejemplo, cabría esperar

que la administración oral requiera dosificaciones más altas que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar usando rutinas empíricas habituales para optimización, como se entenderá bien en la técnica.

### **Bases de datos de las secuencias, secuencias en un medio tangible, y algoritmos**

- 5 Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos forman una fuente de información valiosa con la que determinar sus estructuras en 2 y 3 dimensiones así como para identificar secuencias adicionales de homología similar. Estos abordajes se facilitan más fácilmente mediante almacenamiento de la secuencia en un medio legible de ordenador después usando los datos almacenados en un programa de estructura molecular conocido o buscar una base de datos de secuencias usando herramientas de búsqueda bien conocidas, tal como el paquete de programas GCG.
- 10 La invención también proporciona procedimientos para el análisis de secuencias de caracteres o cadenas, particularmente secuencias genéticas o secuencias de proteínas codificadas. Los procedimientos preferidos de análisis de secuencias incluyen, por ejemplo, procedimientos de análisis de homología de secuencias, tales como análisis de identidad y similitud, análisis de estructura de ADN, ARN y proteínas, conjunto de secuencias, análisis cladístico, análisis de motivos de secuencias, determinación del marco de lectura abierto, llamada de bases de
- 15 ácidos nucleicos, análisis de uso de codones, recortes de bases de ácidos nucleicos, y análisis de picos de cromatogramas de secuenciación.

Un procedimiento basado en ordenador se proporciona para realizar identificación de homología. Este procedimiento comprende las etapas de: proporcionar una primera secuencia de polinucleótidos que comprende la secuencia de un polinucleótido de la invención en un medio legible de ordenador; y comparar dicha primera secuencia de

20 polinucleótidos con al menos una segunda secuencia de polinucleótidos o polipéptidos para identificar homología.

Un procedimiento basado en ordenador se proporciona para realizar identificación de homología, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: proporcionar una primera secuencia de polipéptidos que comprende la secuencia de un polipéptido de la invención en un medio legible de ordenador; y comparar dicha primera secuencia de polipéptidos con al menos una segunda secuencia de polinucleótidos o polipéptidos para identificar homología.

### **Definiciones**

“Identidad”, como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, según el caso, determinado comparando las secuencias. En la técnica, “identidad” también significa el grado de relación de la secuencia entre secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas, como puede ser el caso determinado por la correspondencia entre cadenas de dichas secuencias. La “identidad” se puede

30 calcular con facilidad mediante procedimientos conocidos, que incluyen pero sin limitación, los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M. ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of SECquence Data, Part I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; SECquence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y SECquence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math, 48: 1073 (1988). Se diseñan procedimientos para determinar la identidad para dar la mayor coincidencia entre las secuencias analizadas. Además, los procedimientos para determinar la identidad se codifican en programas informáticos disponibles para el público. Los procedimientos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, entre otros, el programa GAP del paquete del programa GCG (Devereux, J., y col., Nucleid Acids Research

35 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN (Atschul, S.F. y col., J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990), y FASTA (Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448 (1988). La familia de programas BLAST está disponible públicamente en NCBI y otras fuentes BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894;

Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). También se puede usar el algoritmo bien conocido de SmithWaterman para determinar la identidad.

- 45 Los parámetros para la comparación de secuencias de polipéptidos incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)

Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)

Penalización de hueco: 8

- 50 Penalización de longitud de hueco: 2

Un programa útil con estos parámetros está públicamente disponible como el programa de “huecos” de Genetics Computer Group, Madison WI. Los parámetros anteriormente mencionados son los parámetros por defecto para comparaciones de péptidos (junto con ausencia penalización para los huecos en los extremos).

Los parámetros para la comparación de polinucleótidos incluyen los siguientes:

- 55 Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)

Matriz de comparación: coincidencias = + 10, no coincidencia = 0  
 Penalización de hueco: 50  
 Penalización de longitud de hueco: 3

5 Disponible como: El programa de "huecos" de Genetics Computer Group, Madison WI. Estos son los parámetros por defecto para las comparaciones de los ácidos nucleicos.

Un significado preferido de "identidad" para polinucleótidos y polipéptidos, como puede ser el caso, se proporcionan en (1) y (2) más adelante.

(1) Las realizaciones de polinucleótidos incluyen adicionalmente un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 ó 100% de identidad con la secuencia de referencia de la SEC ID. N° 1, en la que dicha secuencia de polinucleótidos puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC ID. N° 1 o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de nucleótidos comparada con la secuencia de referencia, en la que dichas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una deleción, sustitución de nucleótidos, incluyendo transición y transversión, o inserción, y en la que dichas alteraciones se pueden producir en las posiciones terminales 5' y 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre aquellas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia, y en la que dicho número de alteraciones de nucleótidos se determina multiplicando el número total de nucleótidos en la SEC ID N° 1 por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de nucleótidos en la SEC ID N° 1, o

$$20 \quad n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

en la que  $n_n$  es el número de alteraciones de nucleótidos,  $x_n$  es el número total de nucleótidos en la SEC ID. N°: 1, y es 0,50 para 50%, 0,60 para 60%, 0,70 para 70%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85%, 0,90 para 90%, 0,95 para 95%, 0,97 para 97%, o 1,00 para 100%, y  $\cdot$  es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de  $x_n$  e  $y$  se redondea hacia abajo al número entero más cercano antes de restarlo de  $x_n$ . Las alteraciones de una secuencia de polinucleótidos que codifican el polipéptido de la SEC ID N° 2 pueden crear mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de desplazamiento del marco en esta secuencia codificadora y, por lo tanto, alterar el polipéptido codificado por los polinucleótidos después de tales alteraciones.

A modo de ejemplo, una secuencia de polinucleótidos de la presente invención puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC ID. N°: 1, es decir puede ser 100% idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de ácidos nucleicos comparada con la secuencia de referencia de manera que el porcentaje de identidad es menor que 100% de identidad. Dichas alteraciones se seleccionan del grupo que consiste en al menos una deleción, sustitución, incluidas transición y transversión, o inserción de ácido nucleico, en el que dichas alteraciones se pueden producir en las posiciones de los extremos 5' o 3' de la secuencia de polinucleótidos de referencia o en cualquier punto entre dichas posiciones terminales, intercalada bien individualmente entre los ácidos nucleicos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de ácidos nucleicos para un porcentaje de identidad dado se determina multiplicando el número total de ácidos nucleicos en la SEC ID N° 1 por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de ácidos nucleicos en la SEC ID N° 1, o:

$$35 \quad n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

40 en la que  $n_n$  es el número de alteraciones de nucleótidos,  $x$  es el número total de ácidos nucleicos en la SEC ID N° 1, y es por ejemplo, 0,70 para 70%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85%, etc., y  $\cdot$  es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de  $x_n$  e  $y$  se redondea hacia abajo al número entero más cercano antes de restarlo de  $x_n$ .

(2) Las realizaciones de polipéptidos además incluyen un polipéptido aislado que comprende un polipéptido que tiene al menos, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 o 100% de identidad a la secuencia de polipéptidos de referencia de la SEC ID N° 2, en la que dicha secuencia de polinucleótidos puede ser idéntica a la secuencia de referencia de SEC ID N° 2 o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos comparada con la secuencia de referencia, en la que dichas alteraciones se seleccionan entre el grupo constituido por la menos una deleción, sustitución de aminoácidos, incluyendo sustitución, conservadora o y no conservadora, o inserción, y en la que dichas alteraciones se pueden producir en las posiciones terminales amino- o carboxi de la secuencia de polipéptidos de referencia o en cualquier parte entre aquellas posiciones terminales, intercaladas o bien individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia, y en la que dicho número de alteraciones de aminoácidos se determina multiplicando el número total de aminoácidos en la SEC ID N° 2 por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de nucleótidos en la SEC ID N° 2, o

$$45 \quad n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

en la que  $n_a$  es el número de alteraciones de aminoácidos,  $x_a$  es el número total de nucleótidos en la SEC ID N° 2, y es 0,50 para 50%, 0,60 para 60%, 0,70 para 70%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85%, 0,90 para 90%, 0,95 para 95%,

0,97 para 97%, o 1,00 para 100%, y  $\bullet$  es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de  $x_a$  e  $y$  se redondea hacia abajo al número entero más cercano antes de restarlo de  $x_a$ .

A modo de ejemplo, una secuencia de polipéptidos de la presente invención puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC ID N° 2, es decir puede ser 100% idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos comparada con la secuencia de referencia de manera que el porcentaje de identidad es menor que 100% de identidad. Dichas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una deleción, sustitución, incluidas las sustituciones conservadoras y no conservadoras, o inserción de aminoácido, en el que dichas alteraciones se pueden producir en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier punto entre dichas posiciones terminales, intercalada bien individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de aminoácidos para un porcentaje de identidad dado se determina multiplicando el número total de aminoácidos en la SEC ID N° 2 por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de aminoácidos en la SEC ID N° 2, o:

$$n_a \leq X_a - (X_a \bullet y),$$

en la que  $n_a$  es el número de alteraciones de nucleótidos,  $x_a$  es el número total de aminoácidos en la SEC ID N° 2, y es por ejemplo, 0,70 para 70%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85%, etc., y  $\bullet$  es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de  $x_a$  e  $y$  se redondea hacia abajo al número entero más cercano antes de restarlo de  $x_a$ .

“Individuo(s)” cuando en el presente documento se usa con referencia a un organismo, significa un eucariota multicelular, incluyendo, pero sin limitación, un metazoano, un mamífero, un óvulo, un bívulo, un simio, un primate, y un ser humano.

“Aislado” significa alterado “por la mano del hombre” a partir de su estado natural, es decir, si se produce en la naturaleza, se ha cambiado o eliminado de su ambiente natural, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido de origen natural en un organismo vivo no está “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está “aislado”, como se emplea el término en el presente documento. Además, un polinucleótido o polipéptido que se introduce en un organismo mediante transformación, manipulación genética o mediante cualquier otro procedimiento recombinante se “aisla” incluso si todavía está presente en dicho organismo, dicho organismo puede ser vivo o no vivo.

“Polinucleótido(s)” generalmente se refiere a cualquier polirribonucleótido o poidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado incluyendo regiones de una sola o doble hebra.

“Variante” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que se diferencia de un polinucleótido o polipéptido de referencia, pero conserva las propiedades esenciales. Una variante típica de un polinucleótido difiere en una secuencia de nucleótidos de otro, polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden o no alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios de nucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, supresiones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se describe más adelante. Una variante típica de un polipéptido difiere en una secuencia de aminoácidos de otro, polipéptido de referencia. Generalmente, las diferencias se limitan de manera que las secuencias del polipéptido de referencia y la variante sean estrechamente similares en conjunto y, en muchas regiones, idénticas. Una variante del polipéptido de referencia se puede diferenciar en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, deleciones en cualquier combinación. Un residuo de aminoácidos sustituido o insertado puede o no puede estar codificado por el código genético. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede ser de origen natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se conoce que sea de origen natural. Las variantes de origen no natural de polinucleótidos y polipéptidos se pueden preparar mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

“Enfermedad(es)” significa cualquier enfermedad producida por o relacionada con infección por una bacteria, incluyendo, por ejemplo, otitis media en lactantes y niños, neumonía en ancianos, sinusitis, infecciones nosocomiales y enfermedades invasivas, otitis media crónica con pérdida de audición, acumulación de fluido en el oído medio, daño en el nervio auditivo, retraso en el aprendizaje del habla, infección del tracto respiratorio superior e infección del oído medio.

#### **Ejemplos:**

Los ejemplos siguiente se llevaron a cabo usando técnicas estándar, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, excepto donde se describa lo contrario en detalle. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.



**Ejemplo 1: Secuenciación de ADN del gen BASB201 de la cepa 3224A de *Haemophilus influenzae* no tipificable****A: BASB201 en la cepa 3224A de *Haemophilus influenzae* no tipificable.**

5 La secuencia de ADN del polinucleótido BASB201 de la cepa 3224A de *Haemophilus influenzae* no tipificable (también denominada cepa ATCC PT-1816) se muestra en la SEC ID N° 1. La traducción de la secuencia de polinucleótidos BABS201 se muestra en la SEC ID N° 2.

**B: BASB201 en la cepa 3224A de *Haemophilus influenzae* no tipificable.**

10 La secuencia del polinucleótido BASB201 se confirmó en la cepa 3224A de *Haemophilus influenzae* no tipificable. Con este fin, el ADN plasmídico (véase el ejemplo 3A) que contiene la región génica que codifica BASB201 de la cepa 3224A de *Haemophilus influenzae* no tipificable se sometió a secuenciación de ADN usando el kit Big Dyes (Applied bio-systems) y se analizó en un secuenciador de ADN ABI 373/A en las condiciones descritas por el suministrador usando los cebadores NTNLPD1 oli3 (5'-GAG CAT CAA TCT ACG CTG AAT -3') [SEC ID N° 10] y NTNLPD1 oli4 (5'-TTT CTT GAC GAA GTG CTT GTT -3') [SEC ID N° 11] específicos del polinucleótido BASB201 y el cebador de secuencia universal M13 (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') [SEC ID N° 12] y el cebador de secuencia inversa M13 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') [SEC ID N° 13] específicos del vector. Como resultado, se obtuvieron las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos deducidos, respectivamente. Usando el programa Clustalx 1.8 se alineó la secuencia de polinucleótidos con la SEC ID N° 1; una comparación pareada de identidades mostró que la secuencia de polinucleótidos fue 100 % idéntica a la SEC ID N° 1 sobre su longitud completa. Usando el mismo programa Clustalx 1.8; la secuencia de polipéptidos se alineó con la SEC ID N° 2; una comparación pareada de identidades mostró que la secuencia de polinucleótidos fue 100 % idéntica a la SEC ID N° 2 sobre su longitud completa.

**Ejemplo 2:****Análisis de variabilidad del gen BASB201 entre cepas de *Haemophilus influenzae* no tipificable**

25 Se extrajo ADN genómico de 3 cepas de *Haemophilus influenzae* NT (presentadas en la tabla 1) como se describe más adelante. Un matraz erlenmeyer de 500 ml que contenía ~ 100 ml de caldo BHI se inoculó con el cultivo de siembra y se cultivó durante ~12-16 horas a 37°C en un incubador con oscilación, ~ 175 rpm, para generar masa celular para aislamiento de ADN. Las células se recogieron mediante centrifugación en un rotor GSA Sorvall a ~ 2000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante. El ADN genómico se extrajo del sedimento de las células de *Haemophilus influenzae* NT usando el kit de extracción de ADN genómico QIAGEN (Qiagen GmbH). 1 µg de este material se sometió a amplificación de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores MCM029 (5'-AGA TTT GCG AGT TTT ACG AAT TTA-3') [SEC ID N° 14] y MCM032 (5'-AGA GGT ATA AAG TGC GGT AGA-3') [SEC ID N° 15]. Este producto de la PCR se purificó usando el kit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), se sometió a secuenciación del ADN usando el kit Big Dyes (Applied biosystems) y se analizó en un analizador ABI PRISM 310 Genetic Analyser mediante los cebadores MCM029 [SEC ID N° 14], MCM030 (5'-GCA TCA ATC TAC GCT GAA TGA AC-3') [SEC ID N° 16], MCM031 (5'-TGA TCT AGG GCT AAA TTT TTA TTG-3') [SEC ID N° 17] y MCM032 [SEC ID N° 15] en las condiciones descritas por el suministrador. Usando el programa Clustalx 1.8 se realizó una alineación de las secuencias polinucleotídicas y se muestra en la Figura 1. Una comparación pareada de las identidades mostró que las secuencias polinucleotídicas SEC ID N° 3, 5 y 7 eran un 96 y un 99% idénticas a la SEC ID N° 1 (Tabla 2). Usando el programa Clustalx 1.8 se realizó una alineación de las secuencias polipeptídicas y se muestra en la Figura 2. Una comparación pareada de las identidades mostró que las secuencias polipeptídicas SEC ID N° 4, 6 y 8 eran un 94 y un 99% idénticas a la SEC ID N° 2 (Tabla 3).

**Tabla 1: Características de las cepas de *Haemophilus influenzae* NT usadas en este estudio**

Cepa	Aislada en	de	Secuencia de nucleótidos	Secuencia peptídica
3224A	USA	Otitis media	SEC ID N° 1	SEC ID N° 2
3219C	EE.UU.	Otitis media	SEC ID N° 3	SEC ID N° 4
27W116791N1	DK	Fibrosis quística	SEC ID N° 5	SEC ID N° 6
A840164	NL	Cepa portadora	SEC ID N° 7	SEC ID N° 8

**Tabla 2: Comparación pareada de secuencias polinucleotídicas**

	SEC ID N° 1	SEC ID N° 3	SEC ID N° 5	SEC ID N° 7
SEC ID N° 1		99	98	96
SEC ID N° 3			98	96
SEC ID N° 5				96
SEC ID N° 7				

**Tabla 3: Comparación pareada de secuencias polipeptídicas**

	SEC ID N° 2	SEC ID N° 4	SEC ID N° 6	SEC ID N° 8
SEC ID N° 2		99	98	95
SEC ID N° 4			97	94
SEC ID N° 6				95
SEC ID N° 8				

**5 Ejemplo 3: Construcción de plásmido para expresar el BASB201 recombinante****A: Clonación de BASB201.**

Los sitios de restricción *Bam*HI y *Sal*I modificados por ingeniería genética en los cebadores de amplificación directo NTNLPD1 oli1 (5'-AC ATG TTG GGT TTT GGC GTT AAT -3') [SEC ID N° 18] e inverso NTNLPD1 oli2 (5'-AGA TCT ACG AAC CCA CCC CGA TGC AGG -3') [SEC ID N° 19], respectivamente, permitieron la clonación direccional de un producto de PCR en el plásmido pQE60 de expresión de *E. coli* de modo que se pudo expresar una proteína BASB201 como proteína de fusión que contiene una marca de (His)<sub>6</sub> en la cromatografía de afinidad en el extremo C. El producto de PCR BASB201 se introdujo primero en el vector de clonación purificado pCRIITOPO (Invitrogen) usando células bacterianas Top10 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La construcción intermedia se realizó para facilitar la posterior clonación en un vector de expresión. Los transformantes que contienen el inserto de ADN se seleccionaron mediante análisis con enzimas de restricción. Tras la digestión, un alícuota de ~20 µl de la reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8 % de agarosa en un tampón de Tris-acetato-EDTA (TAE). Los fragmentos de ADN se visualizaron mediante iluminación con UV después de la electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. En paralelo con las muestras problema se realizó electroforesis de un ADN de tamaño molecular estándar (marcador de 1 Kb, Life Technologies), que se usó para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN. El plásmido purificado de los transformantes seleccionados se digirió después secuencialmente hasta finalizar con las enzimas de restricción *Bsp*LU11 y *Bgl*II siguiendo las recomendaciones del fabricante (Life Technologies). Después, el fragmento de ADN digerido se purificó usando columnas giratorias gel de sílice antes de la unión en el plásmido pQE60.

**B: Producción del vector de expresión**

Para preparar el plásmido de expresión pQE60 para la unión, se digirió de manera similar hasta finalización con *Nco*I y *Bgl*II. Se usó un exceso de aproximadamente 5 veces molar de los fragmentos digeridos para preparar el vector con el fin de programar la reacción de unión. Se realizó una reacción de unión estándar de ~ 20 µl (~ 16 °C, ~ 16 horas), usando procedimientos bien conocidos en la técnica y con la T4 ADN ligasa (~ 2,0 unidades/reacción, Life Technologies). Una alícuota de la unión (~5 µl) se usó para transformar células M15(pREP4) electrocompetentes de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Después de un período de crecimiento de ~ 2-3 horas a 37 °C en ~ 1,0 ml de caldo LB, las células transformadas se sembraron en placas de agar LB que contenían ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (30 µg/ml). En la selección se incluyó antibiótico. Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C durante ~16 horas. Se escogieron colonias individuales ApR/KanR con mordientes estériles y se usaron para inocular "parches" en placas de ApR/KanR en LB reciente así como ApR/KanR 1,0 ml de caldo de cultivo LB Ap/Kan. Tanto las placas de parche como el caldo de cultivo se incubaron durante toda la noche a 37 °C en un incubador estándar (placas) o un baño de agua en agitación. Se empleó un análisis de PCR basado en células enteras para verificar que los transformantes contenían el inserto de ADN de BASB201. Aquí, ~ 1,0 ml de caldo de cultivo en LB de Kn/Ap durante toda la noche se transfirió a un tubo de polipropileno de 1,5 ml y las células se recogieron mediante centrifugación en una microcentrífuga Beckmann (~ 3 minutos, temperatura ambiente, ~ 12.000 x g). El sedimento celular suspendió en ~ 200 µl de agua estéril y se usó un alícuota de ~ 10 µl para

programar una reacción de PCR de ~ 50 µl de volumen final que contendría cebadores de amplificación de BABS021 tanto directos como inversos. La etapa de inicial de desnaturalización a 95°C se incrementó hasta 3 minutos para asegurar la rotura térmica de las células bacterianas y la liberación del ADN del plásmido. Un ciclador térmico modelo 9700 de ABI y un perfil de amplificación térmica de tres etapas y 32 ciclos, es decir 95 °C, 45 segundos, 55-58 °C, 45 segundos, 72°C 1 minuto, se usaron para amplificar el fragmento de PCR BASB201 a partir de las muestras transformantes lisadas. Tras la amplificación térmica, un alícuota de ~ 20 µl de la reacción se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8 % de agarosa en un tampón de Tris-acetato-EDTA (TAE)). Los fragmentos de ADN se visualizaron mediante iluminación con UV después de la electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. En paralelo con las muestras problema se realizó electroforesis de un ADN de tamaño molecular estándar (marcador de 1 Kb, Life Technologies), que se usó para estimar el tamaño de productos de la PCR. Los transformantes que producían el producto de PCR del tamaño previsto se identificaron como cepas que contenían una construcción de expresión de BABS201. El plásmido de expresión que contenía las cepas se analizó después para detectar expresión inducible de BASB201 recombinante.

#### C: Análisis de la expresión de los transformantes positivos en la PCR

Un alícuota del cultivo de siembra durante toda la noche (~ 1,0 ml) se inoculó en un matraz erlenmeyer de 125 ml que contenía ~ 125 ml de caldo LB de Ap/Kn y se cultivó a 37°C con agitación (~ 250 rpm) hasta que la turbidez del cultivo alcanzó una D. O. a 600 de ~ 0,5, es decir, fase semilogarítmica (usualmente aproximadamente 1,5-2,0 horas). En este momento, aproximadamente la mitad del cultivo (~12,5 ml) se transfirió a un segundo matraz de 125 ml y se indujo la expresión de proteína de BASB201 recombinante mediante la adición de IPTG (solución madre 1,0 M preparada en agua estéril, Sigma) hasta una concentración final de 1,0 mM. La incubación de los cultivos tanto inducidos con IPTG como no inducidos continuó durante ~ 4 horas adicionales a 37°C con agitación. Las muestras (~1,0 ml) de cultivos tanto inducidos como no inducidos se retiraron después del período de inducción y las células se recogieron mediante centrifugación en una microcentrífuga a temperatura ambiente durante ~ 3 minutos. Los sedimentos celulares individuales se suspendieron en ~ 50 µl de agua estéril, después se mezclaron con un volumen igual de 2 x de tampón de muestra SDS-PAGE de Lamelli que contenía 2-mercaptoetanol, y se introdujeron en un baño de agua en ebullición durante ~ 3 minutos para desnaturalizar la proteína. Volúmenes iguales (~ 15 µl) de lisados celulares tanto inducidos por IPTG bruto como no inducidos por se cargaron por duplicado en gel de poliacrilamida Tris/glicina al 12% (Minigeles de 1 mm de espesor, Novex). Las muestras de lisados inducidos y no inducidos se sometieron a electroforesis junto con marcadores de peso molecular preteñidos (SeeBlue, Novex) en condiciones convencionales usando un tampón de carrera SDS/Tris/glicina (Bio Rad). Después de electroforesis, se tiñó un gel con azul brillante commassie R250 (BioRad) y, a continuación, se destiñó para visualizar la nueva proteína BASB201 inducible por IPTG. El segundo gel se sometió a electrotransferencia sobre una membrana de PVDF (tamaño de poro 0,45 micrones Novex) durante ~ 2 horas a 4°C usando un aparato de transferencia Mini-Protean II de BioRad y tampón de transferencia de metanol (20 %) de Towbin. El bloqueo de las incubaciones de membrana y de anticuerpos se realizó de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. Un anticuerpo monoclonal anti-RGS (His)<sub>3</sub> seguido de un segundo anticuerpo anti-ratón de conejo conjugado con HPR (QiaGen) se usó para confirmar la expresión y la identidad de la proteína recombinante BASB201. La visualización del patrón reactivo del anticuerpo anti-His se logró usando o bien un sustrato insoluble en ABT o usando Hyperfilm con el sistema de quimioluminiscencia ECL de Amersham.

#### 40 Ejemplo 4: Producción de BASB201 recombinante

##### Cepa bacteriana

Para producir masa celular para la purificación de proteína recombinante se usó una cepa de expresión recombinante de *E. coli* M15(pREP4) que contenía un plásmido (pQE60) que codificaba BASB201 de *haemophilus influenzae* NT. La cepa de expresión se cultivó en placas con agar LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina ("Ap") y 30 µg/ml de kanamicina ("Km") para garantizar el mantenimiento de pQE60 and pREP4. Para crioconservación a -80 °C, la cepa se propagó en caldo LB que contenía la misma concentración de antibióticos, después se mezcló con un volumen igual de caldo LB que contenía glicerol al 30 % (p/v).

##### Medios

El medio de crecimiento usado para la producción de la proteína recombinante consistió en caldo LB (Disco) que contenía 100 µg/ml de AP y 30 µg/ml de Km. Para inducir la expresión de la proteína recombinante BASB201 se añadió al medio de cultivo IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido).

##### Fermentación

En un matraz de siembra erlenmeyer de 100 ml que contenía 10 ml de volumen de trabajo se inocularon 0,3 ml de cultivo congelado descongelado rápidamente o varias colonias de un cultivo selectivos en placas de agar y se incubó durante aproximadamente 12 horas a 37 ± 1 °C en una plataforma de agitación a 150 rpm (Innova 2100, New Brunswick Scientific). Después, este cultivo de siembra se usó para inocular un volumen de trabajo de 500 ml en un erlenmeyer que contiene caldo LB y los antibióticos Ap y Km. Cuando el cultivo alcanzó la fase semilogarítmica de

crecimiento (~ 0,5 unidades de DO 600) al erlenmeyer se añadió IPTG (solución madre de 1,0M, preparada en agua estéril). Se efectuó inducción de las células durante 4 horas, después se recogieron mediante centrifugación usando una centrífuga 28RS Heraeus (Sepatech) o RC5C de supervelocidad (Sorvall Instruments). La pasta celular se almacenó a -20 ° C hasta su procesamiento.

5 Productos químicos y materiales

Imidazol y Triton X-100 se adquirieron en Merck. La guanidina clorhidrato procedía de Fluka. La aprotinina se obtuvo Sigma Chemical Company. Urea y AEBSF procedían de ICN-Biochemicals. Todos los demás productos químicos eran de calidad de reactivo o mejor.

10 La resina Ni-NTA Superflow y el anticuerpo Penta-His, sin BSA se obtuvieron en QiaGen. El ensayo MicroBCA se obtuvo en Pierce; 3 filtros Amicon de Millipore. Las membranas de diálisis (MWCO12-14000) eran de MFPI, EE.UU. El marcador de masa molecular (BenchMark ladder) procedía de Life-technologies.

**Ejemplo 5: Expresión y purificación de la proteína BASB201 recombinante en *Escherichia coli***

Extracción-Purificación

15 La pasta celular del cultivo de 250 ml inducido con IPTG (~ 4 horas, DO620= 0,5) se resuspendió en 20 ml de tampón fosfato a pH 7,5, que contenía AEBSF 1 mM y aprotinina 1 mM como inhibidores de la proteasa. Las células se lisaron en un fragmentador celular. El lisado se centrifugó a 27.000 durante 20 minutos. El sedimento se lavó una vez con tampón fosfato a Ph 7,5 y se centrifugó a 27.000 g durante 20 minutos. El sedimento se suspendió en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8 que contenía cloruro de guanidinio 6, (tampón A) y se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente. El extracto total se centrifugó a 27.000 durante 20 minutos. El sobrenadante se 20 incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con resina Ni-NTA superflow equilibrada en tampón A. La resina se lavó dos veces con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, tampón Tris-Hcl 10 mM a Ph 6,3, que contenía urea 8M (tampón B). La elución se realizó sucesivamente con el tampón B ajustado a pH 5,9 y, después, a pH 4,5. Loas fracciones que contenían la proteína BASB201 se neutralizaron con un volumen del 25 % del tampón fosfato 0,2M a pH 7,5. El análisis SDS-PAGE mostró que el nivel de pureza era inferior al 50 %.

25 **Ejemplo 6: Producción de antisuero frente a BASB201 recombinante**

Se generó antisuero polivalente dirigido contra la proteína BASB201 vacunando conejos con la proteína BASB201 recombinante purificada. También se generó antisuero polivalente dirigido contra la proteína BASB201 vacunando ratones con la proteína BASB201 recombinante purificada. Se extrajo sangre de los animales antes de la primera inmunización ("pre-sangrado") y después de la última inmunización.

30 Los títulos de anti-proteína BASB201 se midieron mediante EILSA usando la proteína BASB201 recombinante purificada como el antígeno de recubrimiento. El título se define como los títulos del punto medio calculados mediante el modelo logístico de 4 parámetros usando el software XL Fit. Los antisueños también se usan como primer anticuerpo para identificar la proteína en una transferencia de tipo western, tal como se describe en el ejemplo 8 más adelante.

35 **Ejemplo 7: Caracterización inmunológica: Exposición en la superficie de BASB201**

Los títulos de anti-proteína BASB201 se determinan mediante ELISA usando células enteras muertas con formalina de *Hae-mophilus influenzae* no tipificable. El título se define como los títulos del punto medio calculados mediante el modelo logístico de 4 parámetros usando el software XL Fit.

**Ejemplo 8. Caracterización inmunológica: Análisis de transferencia de tipo Western**

40 Varias cepas de NTHi, además de aislados clínicos, se cultivaron en placas de agar chocolate durante 24 horas a 36 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se usan varias colonias para inocular caldo de infusión de cerebro-corazón (BHI) suplementado con NAD y hemina, cada uno a 10 µg/ml. Los cultivos se cultivaron hasta que la absorbancia a 620 nm fue de aproximadamente 0,4 y las células se recogieron mediante centrifugación. Después, las células se concentraron y solubilizaron en tampón de muestra PAGE. A continuación, las células solubilizadas se resolvieron en geles de 45 poliacrilamida 4-20 % y las proteínas separadas se transfirieron mediante electroforesis a membranas de PVDF. Las membranas de PVDF se pretrataron después con tampón de saturación. Todas las incubaciones posteriores se llevaron a cabo usando esta temperatura pretratamiento.

Las membranas de PVDF se incubaron con suero preinmunitario o suero inmunitario de conejo o de ratón. Después se lavaron las membranas de PVDF.

50 Las membranas de PVDF se incubaron con Ig de ratón de oveja o anti-conejo marcada con biotina. Las membranas de PVDF se lavaron después 3 veces con tampón de lavado y se incubaron con estreptavidina-peroxidasa. A continuación, las membranas de PVDF se lavaron después 3 veces con tampón de lavado y se desarrolló 4-cloro-1-naftol.

**Ejemplo 9: Caracterización inmunológica: Actividad bactericida**

5 La actividad citotóxica mediada por el complemento de los anticuerpos anti-BASB201 se analizó para determinar la potencial vacuna del antisuero de proteína BASB201 que se preparó como se ha descrito anteriormente. Se investigaron las actividades del suero preinmunitario y el antisuero anti-BASB201 en la participación de la muerte por complemento del NTHi.

Las cepas de NTHi se cultivaron en placas. Se añadieron varias colonias al medio líquido. Los cultivos se cultivaron y recogieron hasta la A620 de aproximadamente 0,4. Después de una etapa, el sedimento se suspendió y se diluyó.

10 Los sueros preinmunitarios y los sueros anti-BASB201 se depositaron en el primer pocillo de una placa de 96 pocillos y las diluciones seriadas se depositaron en los demás pocillos de la misma hilera. El NTHi diluido vivo se añadió después y se incubó la mezcla. Se añadió complemento a cada pocillo a una dilución de trabajo definida previamente en un ensayo de toxicidad.

Cada prueba incluyó un control de complemento (pocillos sin suero que contienen una fuente de complemento activo o inactivo), un control positivo (pocillos que contienen suero con un título conocido de anticuerpos bactericida), un cultivo control (pocillos sin suero ni complemento) y suero control (pocillos sin complemento).

15 Se midió la actividad bactericida del antisuero de conejo o de ratón (50 % de muerte de la cepa homóloga).

**Ejemplo 10: Presencia de anticuerpo frente a BASB201 en sueros convalecientes humanos**

El análisis de transferencia de tipo western de BASB201 recombinante purificada se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 5 anterior, a excepción de que se usó un grupo de sueros humanos de niños infectados con NTHi como preparación del primer anticuerpo.

**20 Ejemplo 11: Eficacia de la vacuna frente a BASB201: Potenciación del aclaramiento den pulmones de NTHi en ratones.**

Este modelo de ratón se basa en el análisis de la invasión pulmonar por NTHi siguiendo una exposición intranasal estándar en ratones vacunados.

25 Los grupos de ratones fueron inmunizados con la vacuna de BASB201. Después del refuerzo, los ratones recibieron instilación de suspensión bacteriana en las fosas nasales con anestesia. Se sacrificó a los ratones entre 30 minutos y 24 horas después de la exposición y se extrajeron los pulmones asépticamente y se homogeneizaron individualmente. El número medio ponderado log<sub>10</sub> de UFC/pulmón se determinó contando las colonias que crecieron en las placas de agar después de la siembra de diluciones del homogeneizado. La media aritmética del El número medio ponderado log<sub>10</sub> de UFC/pulmón y las desviaciones estándar se calcularon para cada grupo. Los resultados se analizaron estadísticamente.

30 En este experimento se inmunizaron grupos de ratones con BASB201 o con una preparación de células enteras muertas (cem) de NTHi o se inmunizaron de forma simulada.

**Ejemplo 12: Inhibición de la adhesión de NTHi en células mediante antisuero anti-BASB201**

35 Este ensayo mide la capacidad del suero anti-BASB201 para inhibir la adhesión de bacterias NTHi a células epiteliales.

Esta actividad podría evitar la colonización de la nasofaringe por NTHi.

40 Un volumen de bacterias se incubó en hielo con un volumen de dilución de suero preinmunitario o inmunitario anti-BASB201. Posteriormente, esta mezcla se añadió a los pocillos de una placa de 24 pocillos que contenía un cultivo de células confluentes que se lavó una vez con medio de cultivo para eliminar los restos de antibiótico. La placa se centrifugó y se incubó.

Después, cada pocillo se lavó suavemente. Después del último lavado, se añadió a los pocillos glicocolato sódico. Después de la incubación se raspó la capa celular y se homogeneizó. Las diluciones del homogeneizado se sembraron en placas de agar y se incubaron. Se contó el número de colonias de cada placa y se calculó el número de bacterias presentes en cada pocillo.

**45 Ejemplo 13: Epítosos útiles**

50 Los epítosos de linfocitos B de una proteína se localizan principalmente en su superficie. Para predecir los epítosos de linfocitos B del polipéptido BASB201 se combinaron dos procedimientos: Predicción de la estructura bidimensional y predicción del índice antigénico. La predicción de la estructura bidimensional se realizó usando el programa PSIPRED (de David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University, Uxbridge UB8 3PH, Reino Unido) (Fig. 3). El índice antigénico se calculó sobre la base del procedimiento descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]). Los parámetros usados en este programa son el índice antigénico

y la longitud mínima de un péptido antigénico. Un índice antigénico de 0,9 para un mínimo de 5 aminoácidos consecutivos se usó como umbral para el programa. Los péptidos que comprenden buenos potenciales epítomos de linfocitos B se indican en la tabla 4. Estos pueden ser útiles (preferentemente conjugados o unidos de forma recombinante a una proteína más grande) en una composición de vacuna para la prevención de infecciones por NTHi, como podrían también péptidos similares que comprenden mutaciones conservadoras (preferentemente 70, 80, 95, 99 o 100% idénticas a las secuencias de la tabla 4) o truncamientos que comprenden 5 o más (p. ej., . 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 o 20) aminoácidos o extensiones que comprenden, por ejemplo 1, 2, 3, 5, 19 aminoácidos más en cualquiera de los dos extremos del contexto nativo del polipéptido BASN201 que conserva un epítomo eficaz que puede producir una respuesta inmunitaria en un huésped contra el polipéptido BASB201.

10

**Tabla 4: Potenciales epítomos de linfocitos B de la SEC ID N° 2**

Posición	Secuencia
28	VSQSSDLNLIQKQIKQQESKIEKQKQLQQTKL
62	LKKHESKI
85	EIRKQ
93	ADKQFKQLEKQEREQKARL
135	DPTKAERM
177	QQKNHRNQLSTQKKQQQLQKAQQEHQSTLNELNK
224	KANEQALRQEIQRAEQAAREQEKREALAQRQKAEKRTSKPYQPTVQE
286	AKKQY
398	RKGTP

Los epítomos de linfocitos T colaboradores son péptidos unidos a moléculas HLA de clase II y reconocidos por los linfocitos T colaboradores. La predicción de epítomos de linfocitos T colaboradores útiles del polipéptido BASB201 se basó en el procedimiento TERITOPE descrito por Stumilo y col. (Nature Biotech. 17: 555-561 [1999]). Los péptidos que comprenden buenos potenciales epítomos de linfocitos B se indican en la tabla 5. Estos pueden ser útiles (preferentemente conjugados con péptidos, polipéptidos o polisacáridos) con fines vacunales, como podrían también péptidos similares que comprenden mutaciones conservadoras (preferentemente 70, 80, 95, 99 o 100% idénticas a las secuencias que figuran más adelante) o truncamientos que comprenden 5 o más (p. ej., . 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18) aminoácidos o extensiones que comprenden, por ejemplo 1, 2, 3, 5, 10 aminoácidos más en cualquiera de los dos extremos del contexto nativo del polipéptido BASB201 que conserva un epítomo eficaz de linfocitos T colaboradores que del polipéptido BASB201.

15

20

**Tabla 5: Potenciales epítomos de linfocitos T colaboradores de la SEC ID N° 2**

Posición	Secuencia
1	MLRFGVNQKT
12	LLLTALLSC
22	LLIFSPVSQSS
37	IQKQIKQQE
58	LQANLKKHE
69	INSVASELL
81	ISLKEIRKQ
97	FKQLEKQER
118	IYRSGINPSL
142	MKVYYQHNLNQVRIEMIDNLKA

Posición	Secuencia
169	VQKKAILSQQKNHR
209	LNKNLALDQ
220	LNALKANEQ
230	LRQEIQRAE
252	LAQRQKAAE
271	VQERQLLNS
299	LHTFGSIQAGEVRWKGMMVIGASAGT
338	YLNQYGYMVIVKHGET
358	YGFNQAVSVKVGQLVSAGQ
392	LYFGISRKG

5 Todas las regiones identificadas que contienen epítomos como se ha definido anteriormente están respecto a la SEC ID N° 2. Las regiones correspondientes en las SEC ID N° 4, 6, 8 como se ha definido con la posición en las tablas 4 y 5 con respecto a la SEC ID N° 2 y por su péptido correspondiente en la alineación de la figura 2 para la SEC ID N° 4, 6 8 también son péptidos preferidos de la invención, tal como se describe en este ejemplo. 4

#### **Materiales depositados**

Un depósito que contiene una cepa 3 (cepa 3224A) se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos tipo (ATCC) el 5 de mayo de 2000 y se le asignó el número de depósito PTA-1816.

10 El depósito de la cepa de *Haemophilus influenzae* no tipificable se denomina, en el presente documento, "cepa depositada" o "AND de la cepa depositada".

La cepa depositada contiene un gen de BASB201 de longitud completa.

La secuencia de polinucleótidos contenida en la cepa depositada, así como la secuencia de aminoácidos de cualquier polipéptido codificado en ella, se controlan en el caso de cualquier conflicto con cualquier descripción de las secuencias en el presente documento.

15 El depósito de las cepas depositadas se ha hecho bajo los términos del Tratado de Budapest en el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para propósitos de procedimiento de patente. La cepa depositada se liberará irrevocablemente y sin restricción o condición al público tras la expedición de una patente. La cepa depositada se proporciona meramente como conveniencia para los expertos en la técnica y no son una admisión de que se requiera un depósito para habilitación, tal como el requerido bajo 35 U. S. C. § 112. Es posible que sea  
20 necesario obtener una licencia para fabricar, usar o vender la cepa depositada o compuestos derivados de la misma y, por tanto, no se garantiza ninguna licencia de este tipo en el presente documento.

**INFORMACIÓN DE LA SECUENCIA**

**Secuencias de polinucleótidos y polipéptidos BASB201**

**SEC ID Nº 1 Secuencia de polinucleótido BASB201**

ATGTTGCGTTTTGGCGTTAATCAAAAAACATCATTATTATTAACCGCACTTTTAAGCTGCGGTTTATTAATA  
 TTTTCGCCTGTCAGCCAATCTCCGATCTCAATCAAATTCAAAAACAAATTAAGCAACAAGAATCTAAAATT  
 GAGAAACAAAAGCTTCAGCAAATAAGTTGCAAGCGAATTTAAAAAACACGAGAGTAAAATTAACAGTGTT  
 GCGAGTGAAGTCTTGAACCGAAATAAGTTTAAAGGAAATTCGTAAGCAAATGCGGATGCAGATAAGCAA  
 TTCAAACAATTAGAAAAACAGGAACGTGAGCAAAAAGCAGATTAGCCAAACAAATAGATATAATTTATCGT  
 TCAGGCATTAATCCATCGCTGATTGAACGAATGTTTGCCAAAGATCCGACAAAAGCAGAGCGAATGAAAGTT  
 TATTATCAGCATTAAATCAAGTTCCGATTGAAATGATTGATAATTTAAAAGCAACGCAAGCACAAATTGCA  
 GTACAAAAAAGGCGATTCTCTCTCAACAAAAGAATCACCGAAATCACTTTCCACACAAAAAACAACAA  
 CAAGCATTGCAAAAAGCACAGCAAGAGCATCAATCTACGCTGAATGAATCAATAAAAAATTTAGCCCTAGAT  
 CAAGATAAATTGAATGCACTAAAAGCAAACGAACAAGCACTTCGTCAAGAAATTCACGAGCTGAACAAGCA  
 GCACGCGAACAAGAAAACGTGAAAGAGAGGCACTTGTCTCAACGCCAAAAGCTGAAGAAAAACGAACATCA  
 AAGCCTTATCAACCAACTGTGCAAGAACGCCAATTACTTAATAGTACAAGCGGTTTAGGGGCGCAAAAAA  
 CAATATTCCCTACCAGTTTCTGGTTCAATTTTGATACTTTTGGTTCTATTCAAGCAGGCGAAGTACGTTGG  
 AAAGGTATGGTAATTGGCGCATCAGCAGGCACGCTGTTAAAGCAATTGCTGCTGGACGCGTCATTTTAGCG  
 GGATATTTAAATGGTTATGGTTATATGGTTATTGTTAAACACGGCGAACTGATTTAAGTTTATATGGCTTC  
 AATCAAGCTGTATCAGTGAAGTTGGTCAGCTTGTTCAGCAGGGCAGGTTATTGCTCAAGTAGGAAATACA  
 GGGGAAATATCACGTTCTGCGCTTATTTTGGTATTAGCCGTAAAGGAACGCCAGTAAATCCTGCAGGGTGG  
 GTTCGTTGA

**5 SEC ID Nº 2 Secuencia de polipéptido BASB201**

MLRFGVNVQKTSLLLLTALLSCGLLI FSPVVSQSSDLNQIQKQIKQOESKIEKQKLOQTKLQANLKKHESKIN  
 SVASELLETEIISLKEIRKQIADADKQFKQLEKQEREQKARLAKQIDIIYRSGINPSLIERMFAKDPTKAE  
 RMKVYYQHLNQVRIEMIDNLKATQAQIAVQKKA ILSQKNHRNQLSTQKKQQQALQKAQQEHQSTLNELN  
 KNLALDQDKLNALKANEQALRQEIQRAEQAAREQEKREREALAQRQKAEKRTSKPYQPTVQERQLLNST  
 SGLGAAKKQYSLPVSGSILHTFGSIQAGEVRWKMVIGASAGTPVKAI AAGRVI LAGYLNGYGYMVIKHK  
 GETDLSLYGFNVAVSVKVGQLVSAGQVIAQVGNTGEISRSALYFGISRKGT PVPNPAGWVR

**SEC ID Nº 3 Secuencia de polinucleótido BASB201**

ATGTTGCGTTTTGGCGTTCATCAAAAAACATCATTATTATTAACCGCACTTTTAAGCTGCGGTTTATTAATA  
 TTTTCGCCTGTCAGCCAATCTCCGATCTCAATCAAATTCAAAAACAAATTAAGCAACAAGAATCTAAAATT  
 GAGAAACAAAAGCTTCAGCAAATAAGTTGCAAGCGAATTTAAAAAACACGAGAGTAAAATTAACAGTGTT  
 GCGAGTGAAGTCTTGAACCGAAATAAGTTTAAAGGAAATTCGTAAGCAAATGCGGATGCAGATAAGCAA  
 TTCAAACAATTAGAAAAACAGGAACGTGAGCAAAAAGCAGATTAGCCAAACAAATGGATATAATTTATCGT  
 TCAGGCATTAATCCATCGCTGATTGAACGAATGTTTGCCAAAGATCCGACAAAAGCAGAGCGAATGAAAGTT  
 TATTATCAGCATTAAATCAAGTTCCGATTGAAATGATTGATAATTTAAAAGCAACGCAAGCACAAATTGCA  
 GTACAAAAAAGGCGATTCTCTCTCAACAAAAGAATCACCGAAATCACTTTCCACACAAAAAACAACAA  
 CAAGCATTGCAAAAAGCACAGCAAGAGCATCAATCTACGCTGAATGAATCAATAAAAAATTTAGCCCTAGAT  
 CAAGATAAATTGAATGCCCTAAAAGCAAACGAACAAGCACTTCGTCAAGAAATTCACGAGCTGAACAAGCA  
 GTGCGCGAACAAGAAAACGTGAAAGAGAGGCACTTGTCTCAACGCCAAAAGCTGAAGAAAAACGAACATCA  
 AACCTTATCAACCAACTGTGCAAGAACGCCAATTACTTAATAGTACAAGCGGTTTAGGGGCGCAAAAAA  
 CAATATTCCCTACCAGTTTCTGGTTCAATTTTGATACTTTTGGTTCTATCCAAGCAGGCGAAGTACGTTGG  
 AAAGGTATGGTAATTGGCGCATCAGCAGGCACGCTGTTAAAGCAATTGCTGCTGGACGCGTCATTTTAGCG  
 GGATATTTAAATGGTTATGGTTATATGGTTATTGTTAAACACGGCGAACTGATTTAAGTTTATATGGCTTC  
 AATCAAGCGGTATCAGTGAAGTTGGTCAGCTTGTTCAGCAGGGCAGGTTATTGCTCAAGTAGGAAATACA

GGGGAAATATCACGTTCTGCGCTTATTTTGGTATTAGCCGTAAAGGAACGCCAGTAAATCCTGCAGGGTGG  
 GTTCGTTGA



**SEC ID Nº 4 Secuencia de polipéptido BASB201**

MLRFGVHQKTSLLLLTALLSCGLLIFSPVQSDDLNIQKQIKQOESKIEKQKLOQTKLQANLKKHESKINSV  
 ASELLETEI SLKEIRKQIADADKQFKQLEKQEREQKARLAKQMDIIYRSGINPSLIERMFAKDPTKAERMKV  
 YYQHLNQVRIEMIDNLKATQAQIAVQKKAILSQQKNHRNQLSTQKKQQQALQKAQQEHQSTLNELNKNLALD  
 QDKLNALKANEQALRQEIQRAEQAVREQEKREREAALQRQKAEKRTSKPYQPTVQERQLLNSTSGLGAACK  
 QYSLPVSGSILHTFGSIQAGEVVRWKMVIGASAGTPVKAI AAGRVI LAGYLNNGYGYMVI VVKHGETDLSLYGF  
 NQAVSVKVGQLVSAGQVIAQVGNTEI SRSALYFGI SRKGT PVNPAGWVR

**SEC ID Nº 5 Secuencia de polinucleótido BASB201**

ATGTTGCGTTTAGGCGTTAATCAAAAAACATCATTATTATTAACCGCACTTTTAAGCTGCGGTTTATTAATA  
 TTTTCGCCTGTCAGCCAATCTTCCGATCTCAATCAAATTCAAAAACAAATTAAGCAACAAGAATCTAAAATT  
 GAGAAGCAAAAACCTCAGCAAGCTAAGTTGCAAGCGAATTTAAAAAACACGAGAGTAAAATTAACACCGTT  
 GAGGGCGAACTGCTTCAAACCGAAATAAGTTTAAAGGAAATTCGTAAGCAAATTCGCGATGCAGATAAGCAG  
 CTCAAAACAATTAGAAAAACAGGAACGTGAGCAAAAAGCACGATTAGCCAAAACAATAGATATAATTTATCGT  
 TCAGGCATTAATCCATCGCTGATTGAACGAATGTTTGCCAAAGATCCGACAAAAGCAGAGCGAATGAAAGTT  
 TATTATCAGCATTAAATCAAGTTCGGATTGAAATGATTGATAATTTAAAGCAACGCAAGCACAAATTGCA  
 GTACAAAAAAGGCGATTCTCTCTCAACAAAAGAATCACCGAAATCAACTTCCACACAAAAAACAACAA  
 CAAGCATTGCAAAAAGCACAGCAAGAGCATCAATTTTCGCTGAATGAATCAATAAAAAATTTAGCCCTAGAT  
 CAAGATAAATGAAATGCACTAAAAGCAAACGAACAAGCACTTCGTCAAGAAATTCACGAGCAGAACAAGCA  
 GCACGCGAACAAGAAAAACGTGAAAGAGAGGCACTTGTCTCAACGCCAAAAAGCTGAAGAAAAACGAACATCA  
 AAACCTTATCAACCAACTGTGCAAGAACGCCAATTACTTAATAGTACAAGCGGTTTAGGGGCGGCAAAAAA  
 CAATATTCCTTACCAGTTTCTGGTTCAATTTTGCACTACTTTTGGTTCTATCCAAGCAGGCGAAGTACGTTGG  
 AAAGGTATGGTAATTGGTGCATCAGCAGGCACGCTGTTAAAGCAATTCAGCTGGACGCGTTATTTTAGCG  
 GGATATTTAAATGGTTATGGTTATATGGTTATTTGTTAAACACGGCGAAACTGATTTAAGTTTATATGGCTTC  
 AATCAAGCGGTATCAGTGAAAGTTGGTCACTTGTTCAGCAGGGCAGGTTATTGCTCAAGTAGGAAATACA  
 GGGGAAATATCACGTTCTGCGCTTTATTTTGGTTAGCCGTAAGGAACGCCAGTAAATCCAGCAGGGTGG  
 GTTCGTTGA

**5 SEC ID Nº 6 Secuencia de polipéptido BASB201**

MLRLGVNQKTSLLLLTALLSCGLLIFSPVQSDDLNIQKQIKQOESKIEKQKLOQAKLQANLKKHESKIN  
 TVEGELLETEI SLKEIRKQIADADKQKQLEKQEREQKARLAKQIDIIYRSGINPSLIERMFAKDPTKAE  
 RMKVYYQHLNQVRIEMIDNLKATQAQIAVQKKAILSQQKNHRNQLSTQKKQQQALQKAQQEHQFSLNELN  
 KNLALDQDKLNALKANEQALRQEIQRAEQAVREQEKREREAALQRQKAEKRTSKPYQPTVQERQLLNST  
 SGLGAACKQYSLPVSGSILHTFGSIQAGEVVRWKMVIGASAGTPVKAI AAGRVI LAGYLNNGYGYMVI VVKH  
 GETDLSLYGFNQAVSVKVGQLVSAGQVIAQVGNTEI SRSALYFGI SRKGT PVNPAGWVR

**SEC ID Nº 7 Secuencia de polinucleótido BASB201**

ATGTTGCGTTTAGGCGTTAATCAAAAAACATCATTATTATTAACCGCACTTTTAAGCTGCGGTTTATTAATA  
 TATTTTCGCCTGTCAGCCAATCTTCCGATCTCAATCAAATTCAAAAACAAATTAAGCAACAAGAATCTAA  
 AATTGAGAAGCAAAAACGTGAGCAAACTAAGTTGCAAGCGAATTTAAAAAACACGAGAGTAAAATTAAC  
 ACTGTTAAGGGGAGAACTGCTTCAAACCGAAATAAGTTTAAAGGAAATTCGTAAGCAAATTCGCGATGCAG  
 ATAAGCAGCTCAAACAATTAGAAAAACAGGAACGTGAGCAAAAACACGATTAGCTAAACAAACGGATAT  
 AATTTACCGTTTACGATTAATCCATCGCTGATTGAACGAATGTTTGCCAAAGATCCAACAAAAGCAGAG  
 CGAATGAAAGTTTATTATCAGCATTAAATCAAGTTCGGATTGAAATGATTGATCATTAAAAGCAACGC  
 AAGCAACAATTGCAGTACAAAAAGAGGCGATTCTCGCTCAACAAAAAACCACCGAAATCAACTTCCAC  
 ACAAAAAAACAACAACAAGCATTGCAAAAAGCACAGCAAGAGCATCAATCTACGCTGAATGAATCAAT  
 AAAATTTAGCCCTAGATCAAGATAAATGAAATGCAATAAAAGCAAACGAACAAGCACTTCGTCAAGAAA  
 TTCAACGAGCAGAACAAGCCGCGCGAACAAGAAAAACGTGAAAGAGAGGCACTTGTCTCAACGCCAAAA  
 AGCTGAAGAAAAACGAACATCAAAACCTTATCAACCAACTGTGCAAGAACGCCAATTACTTAATAGTACA  
 AACGGTTTAGGGGCGGCAAAAAACAATATCTCACCAGTTTCTGGTTCAATTTGCATACTTTTGGTT  
 CTATCCAAGCAGGCGAAGTACGTTGGAAAGGTATGGTAATTTGGCGCATCAGCAGGCACGCTGTTAAAGC  
 AATTGCTGCTGGACGTGTGATTTTAGCGGGATATTTGAAATGGCTATGGTTATATGGTTATTTGTTAAACAC  
 GGTGAAACTGATTTAAGTTTATATGGCTTAAATCAAGCGGTGTCAGTGAAAGTTGGTCACTTGNNTCTG  
 CAGGGCAGGTTATTGCTCAAGTAGGAAACACAGGAGAAATTCACGTTCCGCGCTTTATTTTGGTTATTA  
 GCCGAAAAGGACGCCAGTAAATCCTGCAGGGTGGGTTTCGTTGA

**SEC ID N° 8 Secuencia de polipéptido BASB201**

MLRLGVNQKTSLLLTALLSCGLLI FSPVQSDDLNIQKQIKQOESKIEKQKREQTKLQANLKKHESKIN  
 TVKGELLETOISLKEIRKQIADADKQLKQLEKQEREQKTRLAKQTDIIYRSGINPSLIERMFAQDPTKAE  
 RMKVYYQHNLNVRIEMIDHLKATQAQIAVQKEAILAQKNHRNQLSTQKKQQALQKAQQEHQSTLNELN  
 KNLALDQDKLNALKANEQALRQEIQRAEQAAREQEKREREALAQRQKAEKRTSKPYQPTVQERQLNST  
 NGLGAAKKQYSSPVSGSILHTFGSIQAGEVRWKMVIGASAGTPVKAIAAGRVILAGYLNQYGYMVIKHK  
 GETDLSLYGFNQAVSVKVGQLXSAGQVIAQVGNTEISRSALYFGIKPKRTPVNPAGWVR

**SEC ID N° 9 Secuencia de polinucleótido en el lado 5' del codón de iniciación previsto del polinucleótido BASB201**

TGTTGATACTGGTGGTCTGTCGAGCGTTTCAACAGCCGTTTCAAATTTCCAAGCACAAA  
 ATAATTTGGACTTGTAAAACCCGCTAATTTGCGGGGTTTTGTTTTATACAGTTAGA  
 ACAACAATACGTTGAACTTAATTAAGATAGTAATGTTCTACATAATTTAATTTATCATC  
 AAGTTTTAAACTAAAGGCTGACCTGTTGGAATTTCAAATCCATAATTTCAGCATCAGA  
 AATACCGATAATATGTTTTGCCAACGCACGAAGTGAATTACCGTGAGCAACCACTAAAAC  
 ACGTTTGCCAGAAAGCATTGCTGGTGCAATTTGATCTTCCCAGAATGGTAATGCACGTTT  
 TAATGTTAATTTTAAATTTCTGCGTTTGGCACAACATCAGATGGAATATTTGCGTAGCG  
 ACGGTCATTGTGTGCAGAAATTTGGATCTTGTGGATCTAAATCTGGTGGAGAAATGTCGTA  
 AGAACGACGCCAAATATGAACTTGTTCGTCACCGTATTGCTCCGCAGTCGCTTTTTTATC  
 TAAACCTTGTAAGCACCATAATGACGTTCAATTTAAACGCCAGTTTTTCACTTGAGGAAT  
 CCATAATGATGGGATCTTCTAACACGATATTACAAGTTTTGATTGCTCGAGTTAAAAC  
 GGAGGTAATGCGATATCAAATTCATAACCTTTGTCTAACAGTTTTTTACCCGCAGCTTT  
 TGCTTCTTCCACACCAGTTCAGTTAAATTCACATCACGCCAGCCTGTGAATAAGTTTTT  
 CGCATTCCATTCACTAAAACCGTGACGGATAAATACTAATTCATAAGAATCTCCTAATTT  
 TTTTCAAATAAAAAGAACGCACATTTTATAGCAAAAATCCTTAGCTTTAAAAGTTAAAA  
 GGGATGATTTCTGATCTTCAGCAAAAATAACCATCAAATTTTTCGCCTTTTACAAA  
 TATGATAAGATTTGCGAGTTTACGAATTTAGGACGAATTA

5

**SEC ID N° 10**

GAG CAT CAA TCT ACG CTG AAT

**SEC ID N° 11**

TTT CTT GAC GAA GTG CTT GTT

10

**SEC ID N° 12**

GTA AAA CGA CGG CCA GT

**SEC ID N° 13**

CAG GAA ACA GCT ATG AC

15

**SEC ID N° 14**

AGA TTT GCG AGT TTT ACG AAT TTA

**SEC ID N° 15**

AGA GGT ATA AAG TGC GGT AGA

**SEC ID N° 16**

GCA TCA ATC TAC GCT GAA TGA AC

20

**SEC ID N° 17**

TGA TCT AGG GCT AAA TTT TTA TTG

**SEC ID N° 18**

AC ATG TTG GGT TTT GGC GTT AAT

25

**SEC ID N° 19**

AGA TCT ACG AAC CCA CCC CGA TGC AGG

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
  - a) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 99% con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 2 o 6 sobre la longitud completa de dicha secuencia; o
  - 5 b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 97% con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 4 u 8 sobre la longitud completa de dicha secuencia.
2. Un polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos 99% con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 4 u 8 sobre la longitud completa de dicha secuencia.
- 10 3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 2, 4, 6 ó 8.
4. Un polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 2, 4, 6 ó 8.
5. Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 15 6. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado de:
  - a) una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de al menos 99% con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 2 o 6 sobre la longitud completa de dicha secuencia; o
  - b) un polipéptido que tiene una identidad de al menos 97% con una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEC ID N° 4 u 8 sobre la longitud completa de dicha secuencia;
  - 20 o una secuencia de nucleótidos complementaria a dicho polinucleótido aislado.
7. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de:
  - a) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 99% con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado de las SEC ID N° 2, 4 o 6 sobre toda la región codificadora, o
  - 25 b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 97% con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la SEC ID N° 8 sobre la totalidad de la región codificadora;
  - o una secuencia de nucleótidos complementaria a dicho polinucleótido aislado.
8. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de:
  - a) una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de al menos 99% con una secuencia de ADN seleccionada de las SEC ID N° 1, 3 o 5 sobre la longitud completa de dicha secuencia; o
  - 30 b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos 97 % con una secuencia de ADN seleccionada de la SEC ID N° 7 sobre la longitud completa de dicha secuencia;
  - o una secuencia de nucleótidos complementaria a dicho polinucleótido aislado.
9. El polinucleótido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que la identidad es al menos del 99 % con una secuencia de ADN de la SEC ID N° 7.
- 35 10. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado de las SEC ID N° 2, 4, 6 u 8.
11. Un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido seleccionado de las SEC ID N° 1, 3, 5 ó 7.
12. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11.
- 40 13. El vector de expresión de la reivindicación 12, en el que el polinucleótido aislado es recombinante.
14. El vector de expresión de la reivindicación 12, que comprende una región en el lado 5' modificada de dicho polinucleótido, región en el lado 5' modificada que contiene un elemento regulador heterólogo fuerte de dicho polinucleótido.
- 45 15. Un microorganismo vivo recombinante que comprende el vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14.
16. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a

14 o una fracción subcelular o una membrana de dicha célula hospedadora que expresa el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

5 17. Un procedimiento para producir un polipéptido recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende cultivar una célula hospedadora de la reivindicación 16 en condiciones suficientes para la producción de dicho polipéptido y recuperar el polipéptido del medio de cultivo.

18. Un procedimiento para producir una vacuna que comprende las etapas de la reivindicación 17 y, además, que comprende la etapa de formular dicho polipéptido recombinante con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 19. Un procedimiento para expresar un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11 que comprende transformar una célula hospedadora con un vector de expresión que comprende al menos uno de dichos polinucleótidos y cultivar dicha célula hospedadora en condiciones suficientes para la expresión de uno cualquiera de dichos polinucleótidos.

15 20. Una vesícula de membrana externa bacteriana que comprende un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una proteína de fusión que comprende dicho polipéptido, vesícula de membrana externa bacteriana que se puede obtener de una célula hospedadora de la reivindicación 16 en la que la célula hospedadora comprende el vector de expresión de la reivindicación 14.

21. Una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de:

- 20 (i) un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; o  
 (ii) un fragmento inmunogénico del polipéptido de las SEC ID N° 2, 4, 6 u 8 y que comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de las mismas y siendo capaz dicho fragmento, si es necesario cuando está acoplado con un transportador, de producir una respuesta inmunitaria que reconoce un polipéptido de las SEC ID N° 2, 4, 6 ó 8; O  
 (iii) una proteína de fusión que comprende el polipéptido de (i) o el fragmento inmunogénico de (ii); o  
 25 (iv) la vesícula de membrana externa bacteriana de la reivindicación 20 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

22. Una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de:

- 30 (i) un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11; o  
 (ii) un polinucleótido que codifica un fragmento inmunogénico del polipéptido de las SEC ID N° 2, 4, 6 u 8 y que comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de las mismas y siendo capaz dicho fragmento, si es necesario cuando está acoplado con un transportador, de producir una respuesta inmunitaria que reconoce un polipéptido de las SEC ID N° 2, 4, 6 u 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

23. La composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 o 22, en la que dicha composición comprende al menos otro antígeno de *H. influenzae* no tipificable.

35 24. Un anticuerpo inespecífico para un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

25. Un procedimiento de diagnóstico de una infección por *H. influenzae* no tipificable que comprende identificar un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un anticuerpo de la reivindicación 24, presente en una muestra biológica de un animal que se sospecha que sufre dicha infección.

26. Uso de una composición que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de:

- 40 (i) un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; o  
 (ii) un fragmento inmunogénico del polipéptido de las SEC ID N° 2, 4, 6 u 8 y que comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de las mismas y siendo capaz dicho fragmento, si es necesario cuando está acoplado con un transportador, de producir una respuesta inmunitaria que reconoce un polipéptido de las SEC ID N° 2, 4, 6 ó 8; o  
 45 (iii) una proteína de fusión que comprende el polipéptido de (i) o fragmento inmunogénico de (ii); o  
 (iv) la vesícula de membrana externa bacteriana de la reivindicación 20

en la preparación de un medicamento para usar en la generación de una respuesta inmunitaria en un animal.

27. Uso de una composición que comprende una cantidad eficaz de:

- 50 (i) un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11; o  
 (ii) un polinucleótido que codifica un fragmento inmunogénico del polipéptido de las SEC ID N° 2, 4, 6 u 8 y que comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de las mismas y siendo capaz dicho fragmento, si es necesario cuando está acoplado con un transportador, de producir una respuesta inmunitaria que reconoce un polipéptido de las SEC ID N° 2, 4, 6 u 8

en la preparación de un medicamento para usar en la generación de una respuesta inmunitaria en un animal.

28. Una composición terapéutica para usar en el tratamiento de seres humanos con enfermedad por *H. influenzae* no tipificable, que comprende al menos un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 24 y un vehículo farmacéutico adecuado.

5 29. Una composición que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de:

- (i) el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; o
- (ii) un fragmento inmunogénico del polipéptido de las SEC ID N° 2, 4, 6 u 8 y que comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de las mismas y siendo capaz dicho fragmento, si es necesario cuando está acoplado con un transportador, de producir una respuesta inmunitaria que reconoce un polipéptido de las SEC ID N° 2, 4, 6 ó 8; O
- 10 (iii) una proteína de fusión que comprende el polipéptido de (i) o fragmento inmunogénico de (ii); o
- (iv) la vesicular de membrana externa bacteriana de la reivindicación 20

para usar en la generación de una respuesta inmunitaria en un animal.

30. Una composición que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de:

- 15 (i) un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11; o
- (ii) un polinucleótido que codifica un fragmento inmunogénico del polipéptido de las SEC ID N° 2, 4, 6 u 8 y que comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de las mismas y siendo capaz dicho fragmento, si es necesario cuando está acoplado con un transportador, de producir una respuesta inmunitaria que reconoce un polipéptido de las SEC ID N° 2, 4, 6 u 8

20 para usar en la generación de una respuesta inmunitaria en un animal.

31. Una composición de acuerdo con la reivindicación 29 o 30 para usar en el tratamiento o la prevención de la infección por *H. influenzae* no tipificable.

# ES 2 368 728 T3

**Figura 1: Alineación de las secuencias de polinucleótido BASB201.**

La identidad con la SEC ID N° 1 se indica con un punto. El hueco se indica con un guión.

```

                *      20      *      40      *      60
seqid1 : ATGTTGCGTTTTGGCGTTAATCAAAAAACATCATTATTATTAACCGCACTTTAAGCTGC : 60
seqid3 : .....C..... : 60
seqid5 : .....A..... : 60
seqid7 : .....A..... : 60

                *      80      *      100     *      120
seqid1 : GGTTTATTAATATTTTCGCCTGTCAGCCAATCTTCCGATCTCAATCAAATCAAAAACAA : 120
seqid3 : ..... : 120
seqid5 : ..... : 120
seqid7 : ..... : 120

                *      140     *      160     *      180
seqid1 : ATTAAGCAACAAGAATCTAAAATTGAGAAACAAAAGCTTCAGCAAACCTAAGTTGCAAGCG : 180
seqid3 : ..... : 180
seqid5 : .....G....A.....G..... : 180
seqid7 : .....G....A.G.G..... : 180

                *      200     *      220     *      240
seqid1 : AATTAAAAAACACGAGAGTAAAATTAACAGTGTGCGAGTGAACCTGCTTGAAACCGAA : 240
seqid3 : ..... : 240
seqid5 : .....CC....A.G.C..... : 240
seqid7 : .....C....AA.G.A.....C.. : 240

                *      260     *      280     *      300
seqid1 : ATAAGTTTAAAGGAAATTCGTAAGCAAATTGCCGATGCAGATAAGCAATTCAAACAATTA : 300
seqid3 : ..... : 300
seqid5 : .....GC..... : 300
seqid7 : .....GC..... : 300

                *      320     *      340     *      360
seqid1 : GAAAAACAGGAACGTGAGCAAAAAGCACGATTAGCCAAACAAATAGATATAATTTATCGT : 360
seqid3 : .....G..... : 360
seqid5 : ..... : 360
seqid7 : .....A.....T.....CG.....C.. : 360

```

ES 2 368 728 T3

```

          *      380      *      400      *      420
seqid1 : TCAGGCATTAATCCATCGCTGATTGAACGAATGTTTGCCAAAGATCCGACAAAAGCAGAG : 420
seqid3 : ..... : 420
seqid5 : ..... : 420
seqid7 : .....C.....A..... : 420

```

```

          *      440      *      460      *      480
seqid1 : CGAATGAAAGTTTATTATCAGCATTAAATCAAGTTCGGATTGAAATGATTGATAAATTTA : 480
seqid3 : ..... : 480
seqid5 : ..... : 480
seqid7 : .....C..... : 480

```

```

          *      500      *      520      *      540
seqid1 : AAAGCAACGCAAGCACAAATTGCAGTACAAAAAAGGCGATTCTCTCTCAACAAAAGAAT : 540
seqid3 : ..... : 540
seqid5 : ..... : 540
seqid7 : .....G.....G.....A..C : 540

```

```

          *      560      *      580      *      600
seqid1 : CACCGAAATCAACTTTCCACACAAAAAACAACAACAGCATTGCAAAAAGCACAGCAA : 600
seqid3 : ..... : 600
seqid5 : ..... : 600
seqid7 : ..... : 600

```

```

          *      620      *      640      *      660
seqid1 : GAGCATCAATCTACGCTGAATGAACCTCAATAAAAAATTTAGCCCTAGATCAAGATAAATTG : 660
seqid3 : ..... : 660
seqid5 : .....T.T..... : 660
seqid7 : ..... : 660

```

```

          *      680      *      700      *      720
seqid1 : AATGCACTAAAAGCAAACGAACAAGCACTTCGTCAAGAAATTCACGAGCTGAACAAGCA : 720
seqid3 : .....C..... : 720
seqid5 : .....A..... : 720
seqid7 : .....T.....A.....C : 720

```

ES 2 368 728 T3

\* 740 \* 760 \* 780  
seqid1 : GCACGCGAACCAAGAAAAACGTGAAAGAGAGGCACCTTGCTCAACGCCAAAAAGCTGAAGAA : 780  
seqid3 : .TG..... : 780  
seqid5 : ..... : 780  
seqid7 : ..G..... : 780

\* 800 \* 820 \* 840  
seqid1 : AAACGAACATCAAAGCCTTATCAACCAACTGTGCAAGAACGCCAATTACTTAATAGTACA : 840  
seqid3 : .....A..... : 840  
seqid5 : .....A..... : 840  
seqid7 : .....A..... : 840

\* 860 \* 880 \* 900  
seqid1 : AGCGGTTTAGGGGCGGCAAAAAACAATATTCCTTACCAGTTTCTGGTTCAATTTTGCAAT : 900  
seqid3 : ..... : 900  
seqid5 : ..... : 900  
seqid7 : .A.....C..... : 900

\* 920 \* 940 \* 960  
seqid1 : ACTTTTGGTTCTATTCAAGCAGGCGAAGTACGTTGGAAAGGTATGGTAATTGGCGCATCA : 960  
seqid3 : .....C..... : 960  
seqid5 : .....C.....T..... : 960  
seqid7 : .....C..... : 960

\* 980 \* 1000 \* 1020  
seqid1 : GCAGGCACGCCTGTTAAAGCAATGCTGCTGGACGCGTCATTTTAGCGGGATATTTAAAT : 1020  
seqid3 : ..... : 1020  
seqid5 : .....A.....T..... : 1020  
seqid7 : .....T..G.....G... : 1020

\* 1040 \* 1060 \* 1080  
seqid1 : GGTATGGTTATATGGTTATTGTTAAACACGGCGAAACTGATTTAAGTTTATATGGCTTC : 1080  
seqid3 : ..... : 1080  
seqid5 : ..... : 1080  
seqid7 : ..C.....T.....T : 1080



ES 2 368 728 T3

```
          *      1100          *      1120          *      1140
seqid1 : AATCAAGCTGTATCAGTCAAAGTTGGTCAGCTTGTTTCAGCAGGGCAGGTTATTGCTCAA : 1140
seqid3 : .....G..... : 1140
seqid5 : .....G..... : 1140
seqid7 : .....G..G.....N...T..... : 1140
```

```
          *      1160          *      1180          *      1200
seqid1 : GTAGGAAATACAGGGGAAATATCACGTTCTGCGCTTTATTTGGTATTAGCCGTAAAGGA : 1200
seqid3 : ..... : 1200
seqid5 : ..... : 1200
seqid7 : .....C....A....T.....C.....AG.CG...A.G : 1200
```

```
          *      1220          *
seqid1 : ACGCCAGTAAATCCTGCAGGGTGGGTTTCGTTGA : 1233
seqid3 : ..... : 1233
seqid5 : .....A..... : 1233
seqid7 : ..... : 1233
```

# ES 2 368 728 T3

**Figura 2: Alineación de las secuencias de polipéptidos BASB201.**

La identidad con la SEC ID N° 2 está indicada con un punto. El hueco se indica con un guión.

```

                *      20      *      40      *      60
seqid2 : MLRFGVNQKTSLLLTALLSCGLLIFSPVSQSSDLNLIQKQIKQOESKIEKQKIQOTKLQA : 60
seqid4 : .....H..... : 60
seqid6 : ...L.....A.... : 60
seqid8 : ...L.....R..... : 60

                *      80      *      100     *      120
seqid2 : NLKKHESKINSVASELLETEISLKEIRKQIADADKQFKQLEKQEREQKARLAKQIDIYR : 120
seqid4 : ..... : 120
seqid6 : .....EG.....L..... : 120
seqid8 : .....KG.....L.....T....T.... : 120

                *      140     *      160     *      180
seqid2 : SGINPSLIERMPAKDPTKAERMKVYVYQHLNQVRIEMIDNLKATQAQIAVQKKAILSQQKN : 180
seqid4 : ..... : 180
seqid6 : ..... : 180
seqid8 : .....Q.....H.....E...A.... : 180

                *      200     *      220     *      240
seqid2 : HRNQLSTQKKQQALQKAQOEHQSTLNELNKNLALDQDKLNALKANEQALRQEIQRAEQA : 240
seqid4 : ..... : 240
seqid6 : .....F..... : 240
seqid8 : ..... : 240

                *      260     *      280     *      300
seqid2 : AREQEKREREAQAQRQKAEKRTSKPYQPTVQERQLLNSTSGLGAACKQYSLPVSIGSILH : 300
seqid4 : V..... : 300
seqid6 : ..... : 300
seqid8 : .....N.....S..... : 300

                *      320     *      340     *      360
seqid2 : TFGSIQAGEVVRWKGVMVIGASAGTPVKAIAGRVILAGYLNNGYGMVIVKHGETDLSLYGF : 360
seqid4 : ..... : 360
seqid6 : ..... : 360
seqid8 : ..... : 360

```

```

*           380           *           400           *
seqid2 : NQAVSVKVGQLVSAGQVIAQVGNTGEISRSALYFGISRKGTPVNPAGWVR : 410
seqid4 : ..... : 410
seqid6 : ..... : 410
seqid8 : .....X.....K.P.R..... : 410

```

ES 2 368 728 T3

Figura 3: Predicción de la estructura bidimensional, epítomos de linfocitos B y epítomos de linfocitos T colaboradores de polipéptidos BASB201

```

                *      20      *      40      *      60
seqid2 : MLRFGV NQKTS LLLTALLSCGLLIFSPVSQSSDLN QIQKIQKQESKIEKQK LQQT KLQA : 60
seqid4 : .....H..... : 60
seqid6 : ...L.....A... : 60
seqid8 : ...L.....R..... : 60
2D Pred : CEECCCHHHHHHHHHHHHCCCEEECCCCCCCCCHHHHHHHHHHHCHHCCHHHHHHHHH
Epítomo de B : .....BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB..
Epítomo de T : TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT

                *      80      *      100      *      120
seqid2 : NLKKHESKINSVASELLETEISLKEIRKQIADADKQFKQLEKQEREQKARLAKQIDI IYR : 120
seqid4 : ..... : 120
seqid6 : .....EG.....L..... : 120
seqid8 : .....KG.....L.....T.....T..... : 120
2D Pred : HHHHCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
Epítomo de B : .BBBBBBBBB.....BBBBB...BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB.....
Epítomo de T : TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT

                *      140      *      160      *      180
seqid2 : SGINPSLIERMFAKDPTKAERMKVYYQHLNQVRIEMIDNLKATQAQIAVQKKAILSQQKN : 180
seqid4 : ..... : 180
seqid6 : ..... : 180
seqid8 : .....Q.....H.....E...A... : 180
2D Pred : HCCCCCHHHHHCHHCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH
Epítomo de B : .....BBBBBBBBB.....BBBBB.....
Epítomo de T : TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT TTTT

                *      200      *      220      *      240
seqid2 : HRNQLSTQKKQQALQKAQOEHQSTLNELNKNLALDQDKLNALKANEQALRQEIQRAEQA : 240
seqid4 : ..... : 240
seqid6 : .....F..... : 240
seqid8 : ..... : 240
2D Pred : HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCHHHHCCCCC
Epítomo de B : BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB.....BBBBBBBBBBBBBBBBBBB
Epítomo de T : TT.....TTTTTTTTT..TTTTTTTTT.TTTTTTTTTT..

```

ES 2 368 728 T3

```

*          260          *          280          *          300
seqid2 : AREQEKREREALAQRQKAEEKRTSKPYQPTVQERQLLNSTSGLGAACKQYSLPVSGSILH : 300
seqid4 : V_..... : 300
seqid6 : ..... : 300
seqid8 : .....N.....S..... : 300
2D Pred : CCHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCEEE
Epítopo de B : BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB.....BBBBB.....
Epítopo de T : .....TTTTTTTT.....TTTTTTTT.....TT

*          320          *          340          *          360
seqid2 : TFGSIQAGEVRWKGMVIGASAGTPVKAIAAGRVLVILAGYLNQYGYMVIVKHGETDLSLYGF : 360
seqid4 : ..... : 360
seqid6 : ..... : 360
seqid8 : ..... : 360
2D Pred : CCCCCCCCCCEECCECCCCCEEEECCEEEECCEEEECCEEEECCEEEECCEEEECCEEEEC
Epítopo de B : .....
Epítopo de T : TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT.....TTTTTTTTTTTTTTTTTT...TTT

*          380          *          400          *
seqid2 : NQAVSVKVGQLVSAGQVIAQVGTGEISRSALYFGISRKGTVPVNPAGWVR : 410
seqid4 : ..... : 410
seqid6 : ..... : 410
seqid8 : .....X.....KP.R..... : 410
2D Pred : CCECCCCCEEECCCEEECCCEEECCCEEEECCEEEECCEEECCCHHCC
Epítopo de B : .....BBBBB.....
Epítopo de T : TTTTTTTTTTTTTTTTTT.....TTTTTTTT.....

```

**H:** hélice  $\alpha$ , **E:** hebra  $\beta$  **C:** enrollamiento  
**B:** potenciales epítomos de linfocitos B  
**T:** potenciales epítomos de linfocitos T colaboradores