

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 488**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31	(2006.01)	G01N 33/577	(2006.01)
A61K 39/09	(2006.01)	G01N 33/68	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)		
A61K 9/72	(2006.01)		
A61P 31/04	(2006.01)		
A61P 37/04	(2006.01)		
C07K 14/315	(2006.01)		
C07K 16/10	(2006.01)		
C12N 15/63	(2006.01)		
C12P 21/08	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2008** **E 08783266 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012** **EP 2183366**

54 Título: **Polipéptidos inmunógenos y anticuerpos monoclonales**

30 Prioridad:

23.07.2007 US 961723 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2013

73 Titular/es:

SANOPI PASTEUR LIMITED (100.0%)
1755 STEELES AVENUE WEST
TORONTO, ON M2R 3T4, CA

72 Inventor/es:

OCHS, MARTINA;
BROOKES, ROGER;
CHARLEBOIS, ROBERT y
YETHON, JEREMY

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 397 488 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 inmunógenos y anticuerpos monoclonales.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la inmunología, y más particularmente a provocar una respuesta inmunitaria frente a las bacterias.

10 **Antecedentes**

El *Streptococcus pneumoniae* es un patógeno humano bastante ubicuo, que puede infectar a varios órganos, incluyendo los pulmones, el sistema nervioso central (SNC), el oído medio, y el conducto nasal. La infección da como resultado diversos síntomas tales como bronquitis, neumonía, meningitis, infección de los senos nasales, y septicemia. El *S. pneumoniae* es una causa importante de meningitis bacteriana en seres humanos, y está asociado con mortalidad y morbilidad significativas a pesar del tratamiento con antibióticos (Quagliarello et al., (1992) N. Eng. J. Med. 327: 869-872).

Actualmente se dispone de dos vacunas neumocócicas. Una es una vacuna para adultos compuesta de 23 polisacáridos capsulares diferentes que, juntos, representan los tipos capsulares de aproximadamente 90% de las cepas que provocan infección neumocócica. Sin embargo, esta vacuna no es inmunógena en niños, un grupo de edad con susceptibilidad elevada a la infección neumocócica. En adultos, se ha demostrado que la vacuna es aproximadamente 60% eficaz frente a la neumonía bacterémica, pero es menos eficaz en adultos con mayor riesgo de infección neumocócica debido a la edad o a afecciones médicas subyacentes (Fedson, y Musher. 2004. "Pneumococcal Polysaccharide Vaccine", p. 529-588. En Vaccines. S. A. Plotkin y W. A. Orenstein (eds.), W. B. Saunders and Co., Filadelfia, PA; Shapiro et al., N. Engl. J. Med. 325:1453-1460 (1991)). No se ha demostrado que esta vacuna sea eficaz frente a la neumonía neumocócica no bacterémica, la forma más común de infección.

La segunda vacuna disponible es una vacuna conjugada 7-valente, que es eficaz frente a infecciones neumocócicas bacterémicas en niños menores de 2 años de edad. También ha demostrado eficacia frente a neumonía (Black et al., Arch. Pediatr. 11(7):485-489 (2004)). La producción de esta vacuna es complicada debido a la necesidad de producir 7 conjugados diferentes, y esto conduce a que la vacuna sea cara (aproximadamente \$200/niño). Además, la vacuna no realiza un buen trabajo cubriendo las infecciones en el mundo en desarrollo, donde son muy comunes los tipos no vacunales de *Streptococcus pneumoniae* (Di Fabio et al., Pediatr. Infect. Dis. J. 20:959-967 (2001); Mulholland, Trop. Med. Int. Health 10:497-500 (2005)). Esta vacuna no funciona tan bien frente a otitis media y colonización como lo hace frente a enfermedad invasiva. También se ha demostrado que el uso de la vacuna conjugada 7-valente ha conducido a un incremento en la colonización y enfermedad con cepas de tipos capsulares no representadas por los 7 polisacáridos incluidos en la vacuna (Bogaert et al., Lancet Infect. Dis. 4:144-154 (2004); Eskola et al., N. Engl. J. Med. 344:403-409 (2001); Mbelle et al., J. Infect. Dis. 180:1171-1176 (1999)). Por lo tanto, existe la necesidad de tratamientos eficaces para *Streptococcus pneumoniae*.

Sumario

Se describen composiciones y métodos para provocar una respuesta inmunitaria frente a *Streptococcus pneumoniae*. Se proporcionan polipéptidos PhtD inmunógenos, y en particular sus fragmentos, derivados y variantes, así como ácidos nucleicos que los codifican. También se proporcionan anticuerpos monoclonales (e hibridomas que los producen) que tienen especificidad por tales polipéptidos, fragmentos, derivados o variantes. Se proporcionan además métodos para obtener y usar los polipéptidos inmunógenos, derivados, variantes y anticuerpos monoclonales.

Se describe en la presente memoria un ácido nucleico aislado seleccionado del grupo que consiste en: a) un ácido nucleico que codifica un polipéptido de *S. pneumoniae* que tiene al menos 90% de identidad con SEC ID NO:2; b) un ácido nucleico completamente complementario a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de *S. pneumoniae* que tiene al menos 90% de identidad con SEC ID NO:2; y c) un ARN de (a) o (b), en el que U se sustituye por T.

La identidad de secuencia puede ser al menos 85%, 90%, y más preferiblemente 95 a 100%.

También se describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de identidad con SEC ID NO:2, y un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de identidad con SEC ID NO:2.

En otro caso, se describe un ácido nucleico aislado seleccionado del grupo que consiste en: a) un ácido nucleico que codifica un polipéptido de *S. pneumoniae* que tiene al menos 80% de identidad con SEC ID NO:3; b) un ácido nucleico completamente complementario a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de *S. pneumoniae* que tiene al menos 80% de identidad con SEC ID NO:3; y c) un ARN de (a) o (b), en el que U se sustituye por T.

La identidad de secuencia puede ser al menos 85%, 90%, y más preferiblemente 95 a 100%.

También se describe un polipéptido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de identidad con SEC ID NO:3, y también un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de identidad con SEC ID NO:3.

Según otro aspecto de la invención, se proporciona un ácido nucleico aislado seleccionado del grupo que consiste en: a) un ácido nucleico que codifica un polipéptido de *S. pneumoniae* que tiene al menos 80% de identidad con SEC ID NO:4; b) un ácido nucleico completamente complementario a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de *S. pneumoniae* que tiene al menos 80% de identidad con SEC ID NO:4; y c) un ARN de (a) o (b), en el que U se sustituye por T.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, la identidad de secuencia es al menos 85%, 90%, y más preferiblemente 95 a 100%.

La presente invención también proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de identidad con SEC ID NO:4, y también un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de identidad con SEC ID NO:4.

Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un determinante antigénico de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID NO:4.

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el determinante antigénico al que se une específicamente el anticuerpo monoclonal está situado en un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID NO: 4 en una región que comprende el aminoácido 1 y el aminoácido 101.

También se describe en la presente memoria un fragmento inmunógeno seleccionado del grupo que consiste en SEC ID NO.:2, SEC ID NO.:3 y SEC ID NO.:4, o una variante del mismo seleccionado del grupo que consiste en SEC ID NO.:15, SEC ID NO.:16 y SEC ID NO.:17.

En otro caso, se describe un método para inmunizar un hospedante frente a infección y un método para tratar una infección por una bacteria *Streptococcus sp.*, que comprende administrar al hospedante al menos un polipéptido de PhtD seleccionado del grupo que consiste en SEC ID NO.:2, SEC ID NO.:3 y SEC ID NO.:4, o una variante del mismo seleccionado del grupo que consiste en SEC ID NO.:15, SEC ID NO.:16 y SEC ID NO.:17.

En un caso adicional, se describe un anticuerpo monoclonal que tiene la misma especificidad de unión a antígenos que los anticuerpos producidos por el hibridoma que tiene la Designación ATCC n° XXXX.

El anticuerpo monoclonal se puede seleccionar del grupo que consiste en IB12 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, 4D5 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, y 9E11 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX.

También se describe un método para prevenir infección por, y un método para tratar una infección por, una bacteria *Streptococcus sp.* en un hospedante, que comprende administrar al hospedante al menos un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en IB12 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, 4D5 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, y 9E11 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX.

Se pueden administrar al menos dos anticuerpos monoclonales para prevenir la infección y/o para tratar infección por una bacteria *Streptococcus sp.*

En otro caso, se describe un método para determinar la cantidad de una proteína en una muestra biológica, que comprende exponer una muestra biológica de ensayo a un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en IB12 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, 4D5 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, y 9E11 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, o un derivado del mismo, medir la cantidad de anticuerpo o derivado unido a la muestra, y comparar la cantidad de unión en la muestra biológica de ensayo con la cantidad de unión observada en una muestra biológica de control, en el que una mayor unión en la muestra biológica de ensayo con respecto a la muestra biológica de control indica la presencia de la proteína en aquella.

También se describe en la presente memoria un método para detectar una bacteria *Streptococcus sp.* o su proteína en una muestra biológica, comprendiendo el método las etapas de:

(a) exponer una muestra biológica de ensayo a al menos un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en IB12 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, 4D5 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, y 9E11 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, o derivado del mismo, en condiciones que permiten el anticuerpo a un componente de la muestra por el cual tiene especificidad; y

(b) determinar la cantidad de anticuerpo unido a componentes de la muestra biológica de ensayo; y

(c) comparar la cantidad de anticuerpo unido a la muestra biológica de ensayo con la cantidad unida a una muestra de control; en el que la unión de una cantidad significativamente mayor de anticuerpo a componentes de la muestra biológica de ensayo en comparación con la muestra biológica de control indica la presencia de bacteria *Streptococcus* sp. o una proteína de la misma en la muestra.

Se describe en la presente memoria un kit para determinar bacteria *Streptococcus* sp. o una proteína de la misma en una muestra biológica, comprendiendo el kit al menos un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en IB12 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, 4D5 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, y 9E11 producido por el hibridoma de ratón que tiene la Designación ATCC n° XXXX, o un derivado del mismo, e instrucciones para uso.

Además de los aspectos y formas de realización ejemplificativos descritos anteriormente, otros aspectos y formas de realización se pondrán de manifiesto haciendo referencia a las siguientes descripciones detalladas.

Descripción detallada

Se describen en la presente memoria polipéptidos y ácidos nucleicos útiles como agentes o herramientas inmunológicas para identificar los sitios de unión para anticuerpos monoclonales, absorber de sueros policlonales anticuerpos de reactividad cruzada, definir regiones de PhtD que comprenden epítomos protectores, caracterizar la respuesta inmunitaria humana (en ensayos clínicos) a mayor resolución que la producida por la proteína de longitud completa, y que pueden proporcionar ventaja durante la fabricación. Como reactivos de ensayo, esta colección de proteínas truncadas permitirá la caracterización de la contribución individual de PhtD a una vacuna multivalente.

En un caso, las composiciones y metodologías útiles para tratar y/o prevenir condiciones relacionadas con la presencia de organismos que expresan PhtD tales como bacterias *Streptococcus* sp., estimulando una respuesta inmunitaria frente a PhtD y tratando de ese modo el organismo. La respuesta inmunitaria se produce tras la administración de PhtD, un fragmento inmunógeno de la misma, o una variante de la misma, o un ácido nucleico que codifica cualquiera de los mismos, a un hospedante. En tales casos, PhtD, su fragmento inmunógeno, o su variante, actúan como un inmunógeno. Como se usa aquí, un "inmunógeno" es un polipéptido, péptido, fragmento, o variante del mismo, derivándose cada uno de PhtD que produce una respuesta inmunitaria en un hospedante al que se ha administrado el inmunógeno. La respuesta inmunitaria puede incluir la producción de anticuerpos que se unen a al menos un epítomo del inmunógeno y/o la generación de una respuesta inmunitaria celular frente a células que expresan un epítomo del inmunógeno. La respuesta se puede detectar, por ejemplo, como una potenciación de una respuesta inmunitaria existente frente al inmunógeno, por ejemplo detectando una mayor respuesta de anticuerpo (es decir, cantidad de anticuerpo, afinidad/avidez incrementada) o una mayor respuesta celular (es decir, mayor número de células T activadas, mayor afinidad/avidez por receptores de células T). En la técnica se conocen otras medidas de una respuesta inmunitaria, y se podrían utilizar para determinar la presencia de una respuesta inmunitaria en el hospedante. En la técnica existen metodologías estándar para realizar estas determinaciones. En ciertas formas de realización, la respuesta inmunitaria es detectable pero no necesariamente protectora. En tales casos, la composición que comprende el inmunógeno se puede considerar una composición inmunológica. En ciertas formas de realización, la respuesta inmunitaria es protectora, queriendo decir que la respuesta inmunitaria es capaz de prevenir el crecimiento de o eliminar del hospedante el organismo que expresa PhtD (es decir, *Streptococcus* sp.). En tales casos, la composición que comprende el inmunógeno, aunque todavía se considera una composición inmunológica, se puede denominar adicionalmente como una vacuna. En ciertas formas de realización, se utilizan múltiples inmunógenos en una única composición.

Los fragmentos inmunógenos (es decir, inmunógenos) de PhtD se describen en la presente memoria junto con métodos para obtener y usar los fragmentos. Los inmunógenos descritos en la presente memoria incluyen polipéptidos que comprenden PhtD de longitud completa (con o sin la secuencia señal), fragmentos de PhtD, y sus variantes. Se prefiere que las secuencia de aminoácidos utilizadas deriven de PhtD de *Streptococcus pneumoniae* (Número de Acceso GenBank AF318955; Adamou, et al. Infect. Immun. 69 (2), 949-958 (2001)), que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada a continuación:

MKINKKYLAVLALSVCSEYELGRHQAGQVKESNRVSYIDGDQAGQKAENLTPDEVSKR
 EGINAEQIVIKITDQGYVTSHGDHYHYNGKVPYDAI I SEELLMKDPNYQLKDSDIVNEIKG
 GYVIKVDGKYYVYLKDAAHADNIRTKEEIKRQKQEHSHNHGGGSNDQAVVAARAQGRYTDD
GYIFNASDIIEDTGDAYIVPHGDHYHYIPKNELSASELAAAEAYWNGKQGSRPSSSSSYNAN
 PAQPRLSENHNLTVTPTYHQNGENISSLLRELYAKPLSERHVESDGLIFDPAQITSRTARG
 VAVPHGNHYHFIPYEQMSELEKRIARI I PLRYRSNHWWPDSRPEQSPQSTPEPSPSPQPAP
 NPQPAPSNPIDEKLVKEAVRKVG DGYVFEENGVSRY I PAKDLAETAAGIDSKLAKQESLSH
 KLGAKKTDLPSSDREFYNKAYDLLARIHQDLLDNKGRQVDFEALDNLLERLKDVPSPDKVKLV
 DDILAFLAPIRHPERLGGKPNQITYTDDDEIQVAKLAGKYTTEDGYIFDPRDITSDEGDAYVT
 PHMTHSHWIKKDSLSEAERAAAQAYAKEKGLTPPSTDHQDSGNTAKGAEAIYNRVKAACKV
 PLDRMPYNLQYTVEVKNGSLI I PHYDHYHNIKFEWFDEGLYEAPKGYTTLEDLLATVKYYVEH
 PNERPHSDNGFGNASDHVRKNKVDQDSKPDEDKEHDEVSEPTHPESDEKENHAGLNPSADNL
 YKPSTDTEETEEEAEDTTDEAEIPQVENSVINAKIADAEALLEKVTDPSIRQNAMETLTGLK
 SSSLLGTKDNNTISAEVDSLALLKESQPAPIQ (SEC ID nº 1)

Las composiciones inmunógenas preferidas comprenden uno o más polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID NOS. 2, 3, 4, 15, 16 ó 17, por ejemplo. Estos polipéptidos pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos conservativas y/o una secuencia señal y/o un "marcador" detectable tal como His (es decir, MGHHHHHH (SEC ID NO. 18); véanse, por ejemplo, SEC ID NOS. 15-17). Los fragmentos inmunógenos preferidos ejemplares incluyen:

TRUNCAMIENTO 1

WVPDSRPEQSPQSTPEPSPSPQPAPNPQPAPSNPIDEKLVKEAVRKVG DGYVFEENGVSRY
 I PAKDLAETAAGIDSKLAKQESLSHKLGA KKTDLPS DREFYNKAYDLLARIHQDLLDNKG
RQVDFEALDNLLERLKDVPSPDKVKLVDDILAFLAPIRHPERLGGKPNQITYTDDDEIQVAKLA
 GKYTTEDEGYIFDPRDITSDEGDAYVT PHMTHSHWIKKDSLSEAERAAAQAYAKEKGLTPPST
 DHQDSGNTAKGAEAIYNRVKAACKVPLDRMPYNLQYTVEVKNGSLI I PHYDHYHNIKFEWF
 DEGLYEAPKGYTTLEDLLATVKYYVEHPNERPHSDNGFGNASDHVRKNKVDQDSKPDEDKEH
 EVSEPTHPESDEKENHAGLNPSADNLYKPSTDTEETEEEAEDTTDEAEIPQVENSVINAKIA
 DAEALLEKVTDPSIRQNAMETLTGLKSSSSLLGTKDNNTISAEVDSLALLKESQPAPIQ
 (SEC ID nº 2);

TRUNCAMIENTO 2

VKYYVEHPNERPHSDNGFGNASDHVRKNKVDQDSKPDEDKEHDEVSEPTHPESDEKENHAGL
 NPSADNLYKPSTDTEETEEEAEDTTDEAEIPQVENSVINAKIADAEALLEKVTDPSIRQNAM
 ETLTGLKSSSSLLGTKDNNTISAEVDSLALLKESQPAPIQ (SEC ID nº 3); y,

TRUNCAMIENTO 3

HVRKNKVDQDSKPDEDKEHDEVSEPTHPESDEKENHAGLNPSADNLYKPSTDTEETEEEAED
 TTDEAEIPQVENSVINAKIADAEALLEKVTDPsirQNAMETLTGLKSSLLLGTKDNNTISAE
 VDSLLALLKESQPAPIQ (SEC ID nº 4).

Como se menciona anteriormente, los polipéptidos inmunógenos proporcionados en la presente memoria pueden comprender una o más sustituciones de aminoácidos conservativas de los polipéptidos de PhtD inmunógenos (es decir, SEC ID NOS. 2, 3 y/o 4). Por ejemplo, los inmunógenos proporcionados en la presente memoria comprenden una porción C-terminal de la PhtD de origen natural con una o más modificaciones de la secuencia de aminoácidos, de manera que se mantiene alrededor de 60 a alrededor de 99% de identidad o similitud de secuencia con la PhtD de origen natural. Las variantes ejemplificativas tienen secuencias de aminoácidos que son alrededor de 60 a alrededor de 99%, alrededor de 60 a alrededor de 65%, alrededor de 65 a alrededor de 70%, alrededor de 70 a alrededor de 75%, alrededor de 80 a alrededor de 85%, alrededor de 85 a alrededor de 90%, alrededor de 90 a alrededor de 99%, o alrededor de 95 a alrededor de 99% similares o idénticas a SEC ID NOS. 2, 3, 4, 15, 16 y/o 17, y/o cualesquiera fragmentos o derivados de las mismas. Las variantes se seleccionan preferiblemente por su capacidad para funcionar como inmunógenos usando los métodos enseñados aquí, o aquellos disponibles en la técnica.

Las modificaciones adecuadas de las secuencias de aminoácidos incluyen cambios sustitucionales, de inserción, de supresión u otros cambios de los aminoácidos de cualquiera de los polipéptidos de PhtD explicados en la presente memoria: las sustituciones, supresiones, inserciones o cualquier combinación de las mismas se pueden combinar en una única variante en tanto que la variante sea un polipéptido inmunógeno. Las inserciones incluyen fusiones amino y/o carboxi terminales, así como inserciones intrasecuencias de restos de aminoácidos individuales o múltiples restos de aminoácidos. Las inserciones normalmente serán inserciones más pequeñas que aquellas de las fusiones amino o carboxi terminales, por ejemplo del orden de uno a cuatro restos. Las supresiones se caracterizan por la eliminación de uno o más restos de aminoácidos de la secuencia proteica. Típicamente, se suprimen no más de alrededor de 2 a 6 restos en cualquier sitio dentro de la molécula proteica. Estas variantes normalmente se preparan mediante mutagénesis específica del sitio de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína, produciendo de ese modo ADN que codifica la variante, y expresando después el ADN en cultivo de células recombinantes. Las técnicas para obtener mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tiene una secuencia conocida son bien conocidas e incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis de cebador M13 y mutagénesis de PCR. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de restos individuales, pero se pueden producir en un número de diferentes localizaciones de una sola vez. Las variantes sustitucionales son aquellas en las que se ha eliminado al menos un resto y se ha insertado en su lugar un resto diferente. Tales sustituciones generalmente se realizan de acuerdo con la siguiente Tabla 1, y se denominan como sustituciones conservativas y generalmente tienen poco o ningún efecto sobre el tamaño, polaridad, carga, hidrofobia, o hidrofilia del resto de aminoácido en esa posición, y, en particular, no dan como resultado una disminución de la inmunogenicidad. Sin embargo, otras son bien conocidas por los expertos en la materia.

Tabla 1

Restos originales	Sustituciones ejemplificativas	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Ácido 1,4-Diamino-butírico, Gln, Asn	Arg

Restos originales	Sustituciones ejemplificativas	Sustituciones preferidas
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Trp	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Thr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Las variantes como se usan en la presente memoria también pueden incluir alelos de PhtD de origen natural procedentes de cepas de *Streptococcus* alternativas que muestran polimorfismos en uno o más sitios dentro del gen PhtD homólogo. Las variantes se pueden producir mediante técnicas de biología molecular convencionales. Las variantes se describen en la presente memoria con respecto a la similitud o identidad de secuencia en comparación con el gen de origen natural. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente cómo determinar la similitud o identidad de secuencia de dos polipéptidos o ácidos nucleicos. Por ejemplo, la similitud de secuencia se puede calcular después de alinear las dos secuencias de manera que la identidad está en su máximo nivel. Los alineamientos dependen en cierto grado del uso del algoritmo específico en programas de alineamiento. Esto podría incluir, por ejemplo, el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, PNAS USA 85: 2444 (1988), implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), y los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 y los algoritmos descritos por Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1977; Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990; Zuker, M. Science 244:48-52, 1989; Jaeger et al. PNAS USA 86:7706-7710, 1989 y Jaeger et al. Methods Enzymol. 183:281-306, 1989. Nuin et al., BMC Bioinformatics 7:471, 2006 proporciona un repaso reciente de múltiples métodos de alineamiento de secuencias. Se entiende que se puede usar cualquiera de los métodos para determinar típicamente la similitud o identidad de secuencia, y que en ciertos casos los resultados de estos diversos métodos pueden diferir. Cuando la similitud de secuencia se proporciona como, por ejemplo, 95%, entonces tal similitud debe ser detectable con al menos uno de los métodos de cálculo aceptados.

Los polipéptidos inmunógenos descritos en la presente memoria pueden incluir uno o más análogos de aminoácidos o estereoisómeros de origen no natural. Estos análogos de aminoácidos y los estereoisómeros se pueden incorporar fácilmente en cadenas polipeptídicas cargando moléculas de ARNt con el aminoácido de elección y manipulando mediante ingeniería constructos genéticos que utilizan, por ejemplo, codones ámbar, para insertar el aminoácido análogo en una cadena peptídica de una manera específica del sitio (Thorson et al., Methods in Molec. Biol. 77:43-73 (1991), Zoller, Current Opinion in Biotechnology, 3:348-354 (1992); Ibba, Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 13:197-216 (1995), Cahill et al., TIBS, 14(10):400-403 (1989); Benner, TIB Tech, 12:158-163 (1994); Ibba and Hennecke, Biol technology, 12:678-682 (1994)). Se pueden producir fragmentos inmunógenos que se asemejan a péptidos, pero que no están conectados vía un enlace peptídico natural. Por ejemplo, los enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden incluir CH₂NH--, --CH₂S--, --CH₂-CH₂--, --CH=CH-- (cis y trans), --COCH₂--, -CH(OH)CH₂--, y --CHH₂SO-- (estos y otros se pueden encontrar en Spatola, A. F. "Peptide backbone modifications: A structure-activity analysis of peptides containing amide bond surrogates, conformational constraints, and related backbone modifications". En Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, p. 267-357. Weinstein, B. editor, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y. (1983); Morley, Trends in Pharm. Sci. 1(2):463-468 (1980); Hudson, et al., Int J Pept Prot Res 14:177-185 (1979) (-CH₂NH--, CH₂CH₂--); Spatola et al. Life Sci 38:1243-1249 (1986) (--CH H₂--S); Hann, Journal of the Chemical Society: Perkin Transactions 1 p. 307-314 (1982) (--CH-CH-, cis y trans); Almquist et al., J. Med. Chem. 23:1392-1398 (1980) (--COCH₂--); Jennings-White et al., Tetrahedron Lett 23:2533 (1982) (--COCH₂--); Publicación de patente europea nº EP0045665 de Szelke, et al. (1982) (-CH(OH)CH₂--); Holladay et al., Tetrahedron. Lett 24:4401-3404 (1983) (--C(OH)CH₂--); y Hruby Life Sci 31:189-199 (1982) (--CH₂--S-).

Los análogos de aminoácidos y los estereoisómeros tienen a menudo propiedades mejoradas o deseables, tales como producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas mejoradas (semivida, absorción, potencia, eficacia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, amplio espectro de actividades biológicas), y otras. Por ejemplo, se pueden usar D-aminoácidos para generar péptidos más estables, debido a que los D-aminoácidos no son reconocidos por peptidasas de origen natural. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) se puede usar para generar péptidos más estables. Los restos de cisteína se pueden usar para reciclar o unir

dos o más péptidos juntos. Esto puede ser beneficioso para restringir péptidos en conformaciones particulares. (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)).

Otras variantes incluyen aquellas en las que una o más secuencias inmunitarias seleccionadoras de dianas (es decir, GYGRKKRRQRRR (TAT; SEC ID NO.:19), RQIKIWFQNRRMKWKK (AntP; SEC ID NO.:20), SRRHHCRSKAKRSRHH (PER1-1; SEC ID NO.:21), o GRRHHRRSKAKRSR (PER1-2; SEC ID NO.:22)) están enlazadas al polipéptido de PhtD inmunógeno. Las proteínas de fusión inmunógenas se pueden producir así y utilizar en la práctica de la presente invención.

En una forma de realización, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de PhtD tal como cualquiera de las SEC ID NOS. 2, 3, ó 4, o sus variantes (es decir, SEC ID NOS.: 5-10). También se proporcionan variantes de tales secuencias, incluyendo sus variantes degeneradas. En ciertas formas de realización, una molécula de ácido nucleico que codifica las secuencias peptídicas se puede insertar en vectores de expresión, como se explica más abajo con mayor detalle. En tales formas de realización, las secuencias peptídicas están codificadas por nucleótidos que corresponden a la secuencia de aminoácidos. Las combinaciones particulares de nucleótidos que codifican los diversos aminoácidos son bien conocidas en la técnica, como se describe en diversas referencias usadas por los expertos en la materia (por ejemplo, Lewin, B. Genes V, Oxford University Press, 1994), como se muestra en la Tabla 2 a continuación. Las variantes de ácidos nucleicos pueden usar cualquier combinación de nucleótidos que codifique el polipéptido de interés.

TABLA 2

Phe	TTT	Ser	TCT	Tyr	TAT	Cys	TGT
	TTC		TCC		TAC		TGC
Leu	TTA	Pro	TCA	TERM	TAA	TERM	TGA
	TTG		TCG		TAG	Trp	TGG
	CTT		CCT	His	CAT	Arg	CGT
	CTC		CCA		CAC		CGG
	CTA		CCA	Gln	CAA		CGA
	CTG		CCG		CAG		CGG
Ile	ATT	Thr	ACT	Asn	AAT	Ser	AGT
	ATC		ACC		AAC		AGC
	ATA		ACA	Lys	AAA	Arg	AGA
Met	ATG		ACG-		AAG		AGG
Val	GTT	Ala	GCT	Asp	GAT	Gly	GGT
	GTC		GCC		GAC		GGC
	GTA		GCA	Glu	GAA		GGA
	GTG		GCG		GAG		GGG

Los ácidos nucleicos ejemplificativos que codifican los polipéptidos de SEC ID NOS. 2, 3, 4, 15, 16 y 17 (es decir, con y sin un marcador His) se muestran a continuación:

Truncamiento 1 (sin marcador de His)

ATGTGGGTGCCCCGACAGCAGACCCGAGCAGCCCAGCCCCAGAGCACCCCCGAGCCCAGC
 CCCAGCCCCCAGCCCGCCCCCAACCCCCAGCCCGCCCCCAGCAACCCCATCGACGAGAAG
 CTGGTGAAGGAGGCCGTGAGAAAGGTGGGCGACGGCTACGTGTTGAGGAGAACGGCGTG
 AGCAGATACATCCCCGCCAAGGACCTGAGCGCCGAGACCGCCGCCGGCATCGACAGCAAG
 CTGGCCAAGCAGGAGAGCCTGAGCCACAAGCTGGGCGCCAAGAAGACCGACCTGCCCAGC
 AGCGACAGAGAGTTCTACAACAAGGCCTACGACCTGCTGGCCAGAATCCACCAGGACCTG
 CTGGACAACAAGGGCAGACAGGTGGACTTCGAGGCCCTGGACAACCTGCTGGAGAGACTG
 AAGGACGTGCCCAGCGACAAGGTGAAGCTGGTGGACGACATCCTGGCCTTCCTGGCCCCC
 ATCAGACACCCCGAGAGACTGGGCAAGCCCAACGCCAGATCACCTACACCGACGACGAG
 ATCCAGGTGGCCAAGCTGGCCGGCAAGTACACCACCGAGGACGGCTACATCTTCGACCCCC
 AGAGACATCACCAGCGACGAGGGCGACGCCTACGTGACCCCCACATGACCCACAGCCAC
 TGGATCAAGAAGGACAGCCTGAGCGAGGCCGAGAGAGCCGCCGCCAGGCCCTACGCCAAG
 GAGAAGGGCCTGACCCCCCCCAGCACCGACCACCAGGACAGCGGCAACACCGAGGCCAAG
 GCGCCCGAGGCCATCTACAACAGAGTGAAGGCCGCCAAGAAGGTGCCCCTGGACAGAATG

CCCTACAACCTGCAGTACACCGTGGAGGTGAAGAACGGCAGCCTGATCATCCCCACTAC
 GACCACTACCACAACATCAAGTTCGAGTGGTTCGACGAGGGCCTGTACGAGGCCCCCAAG
 GGCTACACCCTGGAGGACCTGCTGGCCACCGTGAAGTACTACGTGGAGCACCCCAACGAG
 AGACCCACAGCGACAACGGCTTCGGCAACGCCAGCGACCACGTGAGAAAGAACAAGGTG
 GACCAGGACAGCAAGCCCGACGAGGACAAGGAGCACGACGAGGTGAGCGAGCCCACCCAC
 CCCGAGAGCGACGAGAAGGAGAACCACGCCGGCCTGAACCCAGCGCCGACAACCTGTAC
 AAGCCCAGCACCGACACCGAGGAGACCGAGGAGGAGGCCGAGGACACCACCGACGAGGCC
 GAGATCCCCCAGGTGGAGAACAGCGTGATCAACGCCAAGATCGCCGACGCCGAGGCCCTG
 CTGGAGAAGGTGACCGACCCCAGCATCAGACAGAACGCCATGGAGACCCTGACCGGCCTG
 AAGAGCAGCCTGCTGCTGGGCACCAAGGACAACAACACCATCAGCGCCGAGGTGGACAGC
 CTGCTGGCCCTGCTGAAGGAGAGCCAGCCCGCCCCCATCCAG (SEC ID nº 5)

Truncamiento 1 (marcado con His):

ATGGGCCACCACCACCACCACCCTGGGTGCCCCGACAGCAGACCCGAGCAGCCCAGCCCC
 CAGAGCACCCCCGAGCCCAGCCCCAGCCCCAGCCCCGCCCCCAACCCCCAGCCCGCCCCC
 AGCAACCCCATCGACGAGAAGCTGGTGAAGGAGGCCGTGAGAAAGGTGGGCGACGGCTAC
 GTGTTTCGAGGAGAACGGCGTGAGCAGATACATCCCCGCCAAGGACCTGAGCGCCGAGACC
 GCCGCCGGCATCGACAGCAAGCTGGCCAAGCAGGAGAGCCTGAGCCACAAGCTGGGCGCC
 AAGAAGACCGACCTGCCCAGCAGCGACAGAGAGTTCTACAACAAGGCCTACGACCTGCTG
 GCCAGAATCCACCAGGACCTGCTGGACAACAAGGGCAGACAGGTGGACTTCGAGGGCCCTG
 GACAACCTGCTGGAGAGACTGAAGGACGTGCCAGCGACAAGGTGAAGCTGGTGGACGAC
 ATCCTGGCCTTCCTGGCCCCCATCAGACACCCCGAGAGACTGGGCAAGCCCAACGCCCAG
 ATCACCTACACCGACGACGAGATCCAGGTGGCCAAGCTGGCCGGCAAGTACACCACCGAG
 GACGGCTACATCTTCGACCCCAGAGACATCACCAGCGACGAGGGCGACGCCTACGTGACC
 CCCCACATGACCCACAGCCACTGGATCAAGAAGGACAGCCTGAGCGAGGCCGAGAGAGCC
 GCCGCCCAGGCCTACGCCAAGGAGAAGGGCCTGACCCCCCCCAGCACCGACCACCAGGAC
 AGCGGCAACACCGAGGCCAAGGGCGCCGAGGCCATCTACAACAGAGTGAAGGCCGCCAAG
 AAGGTGCCCTGGACAGAATGCCCTACAACCTGCAGTACACCGTGGAGGTGAAGAACGGC
 AGCCTGATCATCCCCACTACGACCACTACCACAACATCAAGTTCGAGTGGTTCGACGAG
 GGCTGTACGAGGCCCCCAAGGGCTACACCCTGGAGGACCTGCTGGCCACCGTGAAGTAC
 TACGTGGAGCACCCCAACGAGAGACCCACAGCGACAACGGCTTCGGCAACGCCAGCGAC
 CACGTGAGAAAGAACAAGGTGGACCAGGACAGCAAGCCCGACGAGGACAAGGAGCACGAC
 GAGGTGAGCGAGCCACCCACCCCGAGAGCGACGAGAAGGAGAACCACGCCGGCCTGAAC
 CCCAGCGCCGACAACCTGTACAAGCCCAGCACCGACACCGAGGAGACCGAGGAGGAGGCC
 GAGGACACCACCGACGAGGCCGAGATCCCCAGGTGGAGAACAGCGTGATCAACGCCAAG
 ATCGCCGACGCCGAGGCCCTGCTGGAGAAGGTGACCGACCCAGCATCAGACAGAACGCC
 ATGGAGACCCTGACCGGCCTGAAGAGCAGCCTGCTGCTGGGCACCAAGGACAACAACACC
 ATCAGCGCCGAGGTGGACAGCCTGCTGGCCCTGCTGAAGGAGAGCCAGCCCGCCCCCATC

cag (SEC ID nº 6)

Truncamiento 2 (sin marcador de His)

ATGGTGAAGTACTACGTGGAGCACCCCAACGAGAGACCCACAGCGACAACGGCTTCGGC
AACGCCAGCGACCACGTGAGAAAGAACAAGGTGGACCAGGACAGCAAGCCCGACGAGGAC
AAGGAGCACGACGAGGTGAGCGAGCCCACCCACCCCGAGAGCGACGAGAAGGAGAACCAC
GCCGGCCTGAACCCAGCGCCGACAACCTGTACAAGCCCGAGCACCGACACCGAGGAGACC
GAGGAGGAGGCCGAGGACACCACCGACGAGGCCGAGATCCCCCAGGTGGAGAACAGCGTG
ATCAACGCCAAGATCGCCGACGCCGAGGCCCTGCTGGAGAAGGTGACCGACCCAGCATC
AGACAGAACGCCATGGAGACCCTGACCGGCCTGAAGAGCAGCCTGCTGCTGGGCACCAAG
GACAACAACACCATCAGCGCCGAGGTGGACAGCCTGCTGGCCCTGCTGAAGGAGAGCCAG
CCCGCCCCCATCCAG (SEC ID nº 7)

Truncamiento 2 (marcado con His):

ATGGGCCACCACCACCACCACGTGAAGTACTACGTGGAGCACCCCAACGAGAGACCC
CACAGCGACAACGGCTTCGGCAACGCCAGCGACCACGTGAGAAAGAACAAGGTGGACCAG
GACAGCAAGCCCGACGAGGACAAGGAGCACGACGAGGTGAGCGAGCCCACCCACCCCGAG
AGCGACGAGAAGGAGAACCACGCCGGCCTGAACCCAGCGCCGACAACCTGTACAAGCCC
AGCACCGACACCGAGGAGACCGAGGAGGAGGCCGAGGACACCACCGACGAGGCCGAGATC
CCCCAGGTGGAGAACAGCGTGATCAACGCCAAGATCGCCGACGCCGAGGCCCTGCTGGAG
AAGGTGACCGACCCAGCATCAGACAGAACGCCATGGAGACCCTGACCGGCCTGAAGAGC
AGCCTGCTGCTGGGCACCAAGGACAACAACACCATCAGCGCCGAGGTGGACAGCCTGCTG
GCCCTGCTGAAGGAGAGCCAGCCCGCCCCCATCCAG (SEC ID nº 8)

5

Truncamiento 3 (sin marcador de His)

ATGCACGTGAGAAAGAACAAGGTGGACCAGGACAGCAAGCCCGACGAGGACAAGGAGCAC
GACGAGGTGAGCGAGCCCACCCACCCCGAGAGCGACGAGAAGGAGAACCACGCCGGCCTG
AACCCAGCGCCGACAACCTGTACAAGCCCAGCACCGACACCGAGGAGACCGAGGAGGAG
GCCGAGGACACCACCGACGAGGCCGAGATCCCCCAGGTGGAGAACAGCGTGATCAACGCC
AAGATCGCCGACGCCGAGGCCCTGCTGGAGAAGGTGACCGACCCAGCATCAGACAGAAC
GCCATGGAGACCCTGACCGGCCTGAAGAGCAGCCTGCTGCTGGGCACCAAGGACAACAAC
ACCATCAGCGCCGAGGTGGACAGCCTGCTGGCCCTGCTGAAGGAGAGCCAGCCCGCCCC
ATCCAG (SEC ID nº 9)

10

Truncamiento 3 (marcado con His):

ATGGGCCACCACCACCACCACCACGTGAGAAAGAACAAGGTGGACCAGGACAGCAAG
 CCCGACGAGGACAAGGAGCACGACGAGGTGAGCGAGCCCACCCACCCCGAGAGCGACGAG
 AAGGAGAACCACGCCGGCCTGAACCCAGCGCCGACAACCTGTACAAGCCCAGCACCGAC
 ACCGAGGAGACCGAGGAGGAGGCCGAGGACACCACCGACGAGGCCGAGATCCCCCAGGTG
 GAGAACAGCGTGATCAACGCCAAGATCGCCGACGCCGAGGCCCTGCTGGAGAAGGTGACC
 GACCCCAGCATCAGACAGAACGCCATGGAGACCCTGACCGGCCTGAAGAGCAGCCTGCTG
 CTGGGCACCAAGGACAACAACACCATCAGCGCCGAGGTGGACAGCCTGCTGGCCCTGCTG
 AAGGAGAGCCAGCCCGCCCCCATCCAG (SEC ID nº 10)

- También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que se hibridan en condiciones muy restrictivas a cualquier porción de una sonda de hibridación que corresponde a una secuencia nucleotídica que codifica cualquiera de las SEC ID NOS. 2, 3, 4, 15, 16, y/o 17, o a cualquiera de las SEC ID NOS. 5-10. La porción hibridante del ácido nucleico hibridante tiene típicamente una longitud de al menos 15 (por ejemplo 15, 20, 25, 30, 40, o más) nucleótidos. La porción hibridante es al menos 65%, 80%, 90%, 95%, o 99% idéntica a una porción de la secuencia a la que se hibrida. Los ácidos nucleicos hibridantes son útiles, por ejemplo, como sondas de clonación, cebadores (por ejemplo, cebador de PCR), o sondas de diagnóstico. La estabilidad del híbrido o dúplex de ácido nucleico se expresa como la temperatura de fusión o T_m , que es la temperatura a la que una sonda se disocia de un ADN diana. Esta temperatura de fusión se usa para definir las condiciones de restricción requeridas. Si se identifica que las secuencias están relacionadas y son sustancialmente idénticas a la sonda, en lugar de idénticas, entonces es útil establecer primero la temperatura más baja a la que sólo se produce la hibridación homóloga con una concentración particular de sal (por ejemplo, usando diversas concentraciones de tampón de SSC o SSPE). Suponiendo que un despareamiento de 1% da como resultado una disminución de 1°C en T_m , la temperatura del lavado final en la reacción de hibridación se reduce en consecuencia (por ejemplo, si se buscan secuencias que tienen más de 95% de identidad, la temperatura del lavado final disminuye en 5°C). En la práctica, el cambio en T_m puede estar entre 0,5 y 1,5°C por 1% de despareamiento. Las condiciones muy restrictivas implican una hibridación a 68°C en 5X SSC/5X de disolución de Denhardt/1,0% de SDS, y el lavado en 0,2X SSC/0,1% de SDS a temperatura ambiente. Las "condiciones moderadamente restrictivas" incluyen el lavado en 3X SSC a 42°C. Las concentraciones de sal y las temperaturas se pueden variar para lograr el nivel óptimo de identidad entre la sonda y el ácido nucleico diana. En la técnica existe fácilmente una guía adicional con respecto a tales condiciones de restricción, por ejemplo en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición por Sambrook et al., Cold Spring Harbor Press, 2001.
- Los vectores de expresión también pueden ser adecuados para uso en la práctica de la presente invención. Los vectores de expresión comprenden típicamente una secuencia de flanqueo enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido (la "secuencia codificante"). En otras formas de realización, o en combinación con tales formas de realización, una secuencia de flanqueo es capaz preferiblemente de efectuar la replicación, transcripción y/o traducción de la secuencia codificante, y está operablemente enlazada a una secuencia codificante. Estar "operablemente enlazada" indica que las secuencias de ácidos nucleicos están configuradas para llevar a cabo su función habitual. Por ejemplo, un promotor está enlazado operablemente a una secuencia codificante cuando el promotor es capaz de dirigir la transcripción de esa secuencia codificante. Una secuencia de flanqueo no necesita ser contigua a la secuencia codificante, en tanto que funcione correctamente. De este modo, por ejemplo, las secuencias que intervienen sin traducir pero transcritas pueden estar presentes entre una secuencia promotora y la secuencia codificante, y la secuencia promotora todavía se puede considerar enlazada operablemente a la secuencia codificante. Las secuencias de flanqueo pueden ser homólogas (es decir, de la misma especie y/o cepa como la célula hospedante), heterólogas (es decir, de una especie distinta de la especie o cepa de la célula hospedante), híbridas (es decir, una combinación de secuencias de flanqueo procedentes de más de una fuente), o sintéticas. Una secuencia de flanqueo también puede ser una secuencia que funciona normalmente para regular la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido en el genoma del hospedante.

- En ciertas formas de realización, se prefiere que la secuencia de flanqueo sea una región reguladora transcripcional que dirija la expresión génica de alto nivel en la célula diana. La región reguladora transcripcional puede comprender, por ejemplo, un promotor, potenciador, silenciador, elemento represor, o sus combinaciones. La región reguladora transcripcional puede ser constitutiva o específica de tipo de célula o tejido (es decir, la región conduce mayores niveles de transcripción en un tipo de tejido o célula en comparación con otro). Como tal, la fuente de una región reguladora transcripcional puede ser cualquier organismo procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, con tal de que la secuencia de flanqueo sea funcional en, y pueda ser

activada por, la maquinaria de la célula hospedante. En la práctica de la presente invención se puede utilizar una amplia variedad de regiones reguladoras transcripcionales.

Las regiones reguladoras transcripcionales adecuadas incluyen, entre otras, el promotor de CMV (es decir, el promotor temprano inmediato de CMV); promotores de genes eucariotas (es decir, el gen de ovalbúmina de pollo inducible por estrógenos, los genes de interferón, el gen de tirosina aminotransferasa inducible por glucocorticoides, y el gen de timidina cinasa); los promotores temprano y tardío principales del gen adenovírico; la región del promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); el promotor contenido en la repetición terminal larga (LTR) de 3' del virus del sarcoma de Rous (RSV) (Yamamoto, et al., 1980, *Cell* 22:787-97); el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-TK) (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45); las secuencias reguladoras del gen de metalotionina (Brinster et al., 1982; *Nature* 296:39-42); o en las secuencias reguladoras encontradas en vectores de expresión procariotas tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31), el promotor tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25), o aquellas en el promotor de T7 ARN polimerasa, el promotor de pBAD arabinosa, o el promotor de pTet. Las regiones de control transcripcionales específicas del tipo tisular y/o celular incluyen, por ejemplo, la región de control del gen de elastasa 1, que es activa en células pancreáticas acinares (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); la región de control del gen de insulina, que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); la región de control del gen de inmunoglobulina, que es activa en células linfoides (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-58; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-44); la región de control del virus de tumor mamario de ratón en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-95); la región de control del gen de albúmina en el hígado (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-76); la región de control del gen de alfa-feto-proteína en el hígado (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48; Hammer et al., 1987, *Science* 235:53-58); la región de control del gen alfa 1-antitripsina en el hígado (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:161-71); la región de control del gen de beta-globina en células mieloides (Mogam et al., 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); la región de control del gen de la proteína básica de mielina en células oligodendrocíticas en el cerebro (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-12); la región de control del gen de cadena ligera 2 de miosina en músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); y la región de control del gen de hormona liberadora de gonadotropina en el hipotálamo (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-78), y el promotor de tirosinasa en células de melanoma (Hart, 1. *Semin Oncol* 1996 Feb; 23(1):154-8; Siders, et al. *Cancer Gene Ther* 1998 Sep-Oct; 5(5):281-91). Otros promotores adecuados son conocidos en la técnica.

La molécula de ácido nucleico que codifica el inmunógeno seleccionado como diana se puede administrar como parte de un vector vírico o un vector no vírico. En una forma de realización, un vector de ADN se utiliza para suministrar ácidos nucleicos que codifican el inmunógeno seleccionado como diana y/o moléculas asociadas (por ejemplo, moléculas coestimulantes, citocinas o quimiocinas) al paciente. Al hacerlo, se pueden utilizar diversas estrategias para mejorar la eficiencia de tales mecanismos, incluyendo, por ejemplo, el uso de replicones víricos autorreplicantes (Caley, et al. 1999. *Vaccine*, 17: 3124-2135; Dubensky, et al. 2000. *Mol. Med.* 6: 723-732; Leitner, et al. 2000. *Cancer Res.* 60: 51-55), optimización de codones (Liu, et al. 2000. *Mol. Ther.*, 1: 497-500; Dubensky, *supra*; Huang, et al. 2001. *J. Virol.* 75: 4947-4951), electroporación *in vivo* (Widera, et al. 2000. *J. Immunol.* 164: 4635-3640), incorporación de ácidos nucleicos que codifican moléculas coestimulantes, citocinas y/o quimiocinas (Xiang, et al. 1995. *Immunity*, 2:129-135; Kim, et al. 1998. *Eur. J. Immunol.*, 28:1089-11-03; Iwasaki et al. 1997. *J. Immunol.* 158:4591-3601; Sheerlinck, et al. 2001. *Vaccine*, 19: 2647-2656), incorporación de motivos estimulantes tales como CpG (Gurunathan, *supra*; Leitner, *supra*), secuencias para seleccionar como diana las rutas de procesamiento de ubiquitina o endocíticas (Thomson, et al. 1998. *J. Virol.* 72:2246-2252; Velders, et al. 2001. *J. Immunol.* 166:5366-5373), regímenes de administración combinada (Gurunathan, *supra*; Sullivan, et al. 2000. *Nature*, 408:605-609; Hanke, et al. 1998. *Vaccine*, 16: 439-445; Amara, et al. 2001. *Science*, 292: 69-74), sitios de escisión sensibles a proteosomas, y el uso de vectores de suministro mucosales tales como *Salmonella* (Darji, et al. 1997. *Cell*, 91: 765-775; Woo, et al. 2001. *Vaccine*, 19: 2945-2954). Otros métodos son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen a continuación.

Diversos vectores víricos que se han utilizado con éxito para introducir un ácido nucleico en un hospedante incluyen retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus del herpes, y poxvirus, entre otros. Se entiende en la técnica que muchos de tales vectores víricos están disponibles en la técnica. Los vectores de la presente invención se pueden construir usando técnicas recombinantes estándar ampliamente disponibles para un experto en la materia. Tales técnicas se pueden encontrar en referencias normales de biología molecular tales como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), *Gene Expression Technology* (Methods in Enzymology, Vol. 185, editado por D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), y *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, et al. 1990. Academic Press, San Diego, CA).

Los vectores retrovíricos preferidos son derivados de lentivirus así como derivados de retrovirus murinos o aviares. Los ejemplos de vectores retrovíricos adecuados incluyen, por ejemplo, el virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), el virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), el virus del tumor mamario murino (MuMTV), SIV, BIV, HIV y el virus del sarcoma de Rous (RSV). Un número de vectores retrovíricos puede incorporar múltiples secuencias de ácidos nucleicos exógenas. Puesto que los retrovirus recombinantes son defectuosos, requieren

ayuda a fin de producir partículas vectoriales infecciosas. Esta ayuda se puede proporcionar, por ejemplo, mediante estirpes de células auxiliares que codifican genes estructurales retrovíricos. Las estirpes de células auxiliares adecuadas incluyen $\Psi 2$, PA317 y PA12, entre otras. Los viriones vectoriales producidos usando tales estirpes celulares se pueden usar entonces para infectar una estirpe de células tisulares, tales como células NIH 3T3, para producir grandes cantidades de viriones retrovíricos quiméricos. Los vectores retrovíricos se pueden administrar por métodos tradicionales (por ejemplo, inyección) o mediante implantación de una "línea celular productora" en proximidad a la población de células diana (Culver, K., et al., 1994, Hum. Gene Ther., 5 (3): 343-79; Culver, K., et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 59:685-90); Oldfield, E., 1993, Hum. Gene Ther., 4 (1): 39-69). La estirpe celular productora se manipula mediante ingeniería para producir un vector vírico, y libera partículas víricas en la vecindad de la célula diana. Una porción de las partículas víricas liberadas entran en contacto con las células diana e infectan esas células, suministrando así un ácido nucleico de la presente invención a la célula diana. Tras la infección de la célula diana, se produce la expresión del ácido nucleico del vector.

Los vectores adenovíricos han demostrado ser especialmente útiles para la transferencia génica en células eucariotas (Rosenfeld, M., et al., 1991, Science, 252 (5004): 431-3; Crystal, R., et al., 1994, Nat. Genet., 8 (1): 42-51), el estudio de la expresión de genes eucariotas (Levrero, M., et al., 1991, Gene, 101 (2): 195-202), el desarrollo de vacunas (Graham, F. y Prevec, L., 1992, Biotechnology, 20: 363-90), y en modelos de animales (Stratford-Perricaudet, L., et al., 1992, Bone Marrow Transplant., 9 (Supl. 1): 151-2; Rich, D., et al., 1993, Hum. Gene Ther., 4 (4): 461-76). Las rutas experimentales para administrar Ad recombinante a diferentes tejidos *in vivo* han incluido instilación intratraqueal (Rosenfeld, M., et al., 1992, Cell, 68 (1):143-55) inyección en el músculo (Quantin, B., et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89 (7): 2581-3), inyección intravenosa periférica (Herz, J., y Gerard, R., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90 (7): 2812-6) e inoculación estereotáctica al cerebro (Le Gal La Salle, G., et al., 1993, Science, 259 (5097): 988-90), entre otras.

El virus adenoasociado (AAV) demuestra un nivel elevado de infecciosidad, amplio intervalo de hospedantes y especificidad a la hora de integrarse en el genoma de la célula hospedante (Hermonat, P., et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81 (20): 6466-70). Un virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) es todavía otro sistema vectorial atractivo, especialmente para uso en el sistema nervioso debido a su propiedad neurotrópica (Geller, A., et al., 1991, Trends Neurosci., 14 (10): 428-32; Glorioso, et al., 1995, Mol. Biotechnol., 4 (1): 87-99; Glorioso, et al., 1995, Annu. Rev. Microbiol., 49: 675-710).

El poxvirus es otro vector de expresión útil (Smith, et al. 1983, Gene, 25 (1): 21-8; Moss, et al, 1992, Biotechnology, 20: 345-62; Moss, et al, 1992, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 158: 25-38; Moss, et al. 1991. Science, 252:1662-1667). Los poxvirus que se demuestra que son útiles incluyen el virus de la vacuna, NYVAC, avipox, viruela aviar, viruela del canario, ALVAC, y ALVAC (2), entre otros.

La NYVAC (vP866) se obtuvo de la cepa de la vacuna de Copenhague del virus de la vacuna suprimiendo seis regiones no esenciales del genoma que codifica factores de virulencia conocidos o potenciales (véanse, por ejemplo, las patentes US n^{os} 5.364.773 y 5.494.807). Los loci de supresión también se manipularon mediante ingeniería como loci de receptor para la inserción de genes extraños. Las regiones suprimidas son: gen de timidina cinasa (TK; J2R) vP410; región hemorrágica (u; B13R+B14R) vP553; una región de cuerpo de inclusión de tipo A (ATI; A26L) vP618; gen de hemaglutinina (HA; A56R) vP723; región del gen de intervalo de hospedante (C7L-K1L) vP804; y la subunidad grande de ribonucleótido reductasa (I4L) vP866. NYVAC es una cepa del virus de la vacuna genéticamente manipulada que se generó mediante la supresión específica de dieciocho marcos de lectura abiertos que codifican productos génicos asociados con virulencia e intervalo de hospedante. Se ha demostrado que NYVAC es útil para expresar TAs (véase, por ejemplo, patente US n^o 6.265.189). NYVAC (vP866), vP994, vCP205, vCP1433, placZH6H4Lreverse, pMPC6H6K3E3 y pC3H6FHVB también se depositaron en la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest números de acceso VR-2559, VR-2558, VR-2557, VR-2556, ATCC-97913, ATCC-97912, y ATCC-97914, respectivamente.

Los virus recombinantes a base de ALVAC (es decir, ALVAC-1 y ALVAC-2) también son adecuados para uso en la práctica de la presente invención (véase, por ejemplo, la patente US n^o 5.756.103). ALVAC(2) es idéntica a ALVAC(1), excepto que el genoma de ALVAC(2) comprende los genes E3L y K3L de la vacuna bajo el control de promotores de la vacuna (patente US n^o 6.130.066; Beattie et al., 1995a, 1995b, 1991; Chang et al., 1992; Davies et al., 1993). Se ha demostrado que tanto ALVAC(1) como ALVAC(2) son útiles para expresar secuencias de ADN extrañas, tales como TAs (Tartaglia et al., 1993 a,b; patente US n^o 5.833.975). ALVAC se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, USA, número de acceso de ATCC VR-2547.

Otro vector poxvírico útil es TROVAC. El TROVAC se refiere a un virus de la viruela aviar atenuado que fue un aislado clonado en placa derivado de la cepa de la vacuna FP-1 del virus de la viruela aviar que está autorizada para la vacunación de pollitos de 1 día. TROVAC se depositó igualmente bajo los términos del Tratado de Budapest con el número de acceso ATCC 2553.

Los vectores plasmídicos "no víricos" también pueden ser adecuados en ciertas formas de realización. Los vectores plasmídicos preferidos son compatibles con células hospedantes bacterianas, de insecto y/o de mamíferos. Tales

5 vectores incluyen, por ejemplo, PCR-11, pCR3, y pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alpha (pub. PCT. n° WO 90/14363) y pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY) así como derivados plasmídicos Bluescript® (un fagómido a base de COLE1 de número elevado de copias, Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA), plásmidos de clonación de PCR diseñados para clonar productos de PCR amplificados mediante Taq (por ejemplo, kit TOPO™ TA cloning®, derivados plasmídicos PCR2.1®, Invitrogen, Carlsbad, CA). También se han usado con la actual invención vectores bacterianos. Estos vectores incluyen, por ejemplo, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *Lactobacillus*, *Bacille calmette guérin* (BCG), y *Streptococcus* (véanse, por ejemplo, los documentos WO 88/6626; WO 90/0594; WO 91/13157; WO 92/1796; y WO 92/21376). En la técnica se conocen muchos otros vectores y sistemas de expresión plasmídicos no víricos, y se podrían usar con la actual invención.

15 Otras técnicas de suministro también pueden ser suficientes en la práctica de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, complejos de ADN-ligando, complejos de adenovirus-ligando-ADN, inyección directa de ADN, precipitación con CaPO₄, técnicas de pistola génica, electroporación, y sistemas de dispersión coloidales. Los sistemas de dispersión coloidales incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas, y sistemas a base de lípidos, incluyendo emulsiones de agua en aceite, micelas, micelas mixtas, y liposomas. El sistema coloidal preferido de esta invención es un liposoma, que son vesículas de membranas artificiales útiles como vehículos de suministro *in vitro* e *in vivo*. El ARN, el ADN y los viriones intactos se pueden encapsular dentro del interior acuoso y se pueden suministrar a células en una forma biológicamente activa (Fraley, R., et al., 1981, Trends Biochem. Sci., 6: 77). La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, particularmente fosfolípidos de elevada temperatura de transición de fase, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica, y la presencia de cationes divalentes. Los ejemplos de lípidos útiles en la producción de liposomas incluyen compuestos fosfatidílicos, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingolípidos, cerebrósidos, y gangliósidos. Son particularmente útiles los diacilfosfatidilgliceroles, en los que el resto lipídico contiene de 14-18 átomos de carbono, particularmente de 16-18 átomos de carbono, y está saturado. Los fosfolípidos ilustrativos incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina y diestearoilfosfatidilcolina.

30 También se puede proporcionar una célula cultivada que comprende el vector. La célula cultivada puede ser una célula cultivada transfectada con el vector o una progenie de la célula, en el que la célula expresa el polipéptido inmunógeno. Las estirpes celulares adecuadas son conocidas por los expertos en la materia, y están comercializadas, por ejemplo, por la American Type Culture Collection (ATCC). Las células transfectadas se pueden usar en un método para producir un polipéptido inmunógeno. El método comprende cultivar una célula que comprende el vector en condiciones que permiten la expresión del polipéptido inmunógeno, opcionalmente bajo el control de una secuencia de expresión. El polipéptido inmunógeno se puede aislar de la célula o del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas estándar.

40 Los polipéptidos inmunógenos se pueden obtener usando escisión enzimática estándar de polipéptidos o proteínas más grandes, o se pueden generar enlazando dos o más péptidos o polipéptidos juntos mediante técnicas de química proteica. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos se pueden sintetizar químicamente usando equipo de laboratorio actualmente disponible usando la química de Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonilo) o de Boc (terc-butiloxycarbonilo) (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Mediante reacciones de condensación peptídica, 45 ligación química nativa, química en fase sólida, o ligación enzimática, dos fragmentos se pueden unir covalentemente vía un enlace peptídico a sus términos carboxilo y amino para formar un polipéptido de PhtD inmunógeno. (Synthetic Peptides: A User Guide., Grant, ed., W.H. Freeman and Co., Nueva York, N.Y. (1992); Principles of Peptide Synthesis., Bodansky y Trost, eds. Springer-Verlag Inc., Nueva York, N.Y. (1993); Abrahmsen L et al., Biochemistry, 30:4151 (1991); Dawson et al. Science, 266:776-779 (1994); Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª Edición, Stewart, ed., Pierce Chemical Company, Rockford, IL, (1984).

50 Los polipéptidos inmunógenos y composiciones que comprenden uno o más polipéptidos se pueden usar para generar anticuerpos. De este modo, un método para generar anticuerpos específicos para PhtD en un sujeto comprende administrar al sujeto un fragmento de PhtD inmunógeno descrito en la presente memoria. También se proporcionan en la presente memoria anticuerpos (o sus fragmentos o derivados) que se unen a los polipéptidos de PhtD.

60 Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, pueden ser completamente humanos o humanizados, e incluyen anticuerpos de origen natural y anticuerpos monocatenarios. Los anticuerpos se pueden obtener *in vivo* administrando a un sujeto un polipéptido de PhtD inmunógeno o su fragmento o derivado. La producción *in vitro* de anticuerpos incluye obtener anticuerpos monoclonales usando métodos de hibridoma. Los métodos de hibridoma son bien conocidos en la técnica, y están descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975) y Harlow y Lane. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988).

65 Los métodos para la producción de anticuerpos monocatenarios son bien conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, la patente US n° 5.359.046. Un anticuerpo monocatenario se crea fundiendo juntos los dominios

variables de las cadenas pesada y ligera usando un ligador peptídico corto, reconstituyendo de ese modo un sitio de unión a antígeno en una única molécula. Se han desarrollado fragmentos variables de anticuerpos monocatenarios (scFvs) en los que el término C de un dominio variable está unido al término N del otro dominio variable vía un péptido o ligador de 15 a 25 aminoácidos sin interrumpir significativamente la unión al antígeno o la especificidad de la unión. El ligador se escoge para permitir que la cadena pesada y la cadena ligera se unan juntas en su orientación conformacional apropiada. Véase, por ejemplo, Huston, J. S., et al., *Methods in Enzym.* 203:46-121 (1991).

Los anticuerpos completamente humanos y humanizados frente a los polipéptidos de PhtD se pueden usar en los métodos descritos en la presente memoria. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos procedentes de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos procedentes de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de armazón de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Se pueden emplear animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, con la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos (es decir, anticuerpos completamente humanos). La supresión homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J(H)) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del conjunto génico inmunoglobulínico de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos con la exposición al antígeno (véanse, por ejemplo, Jakobovits et al., *PNAS USA*, 90:2551-255 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993)). Los anticuerpos humanos también se pueden producir en librerías de presentación de fagos (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Las técnicas de Cote et al. y Boerner et al. también describen métodos para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, et al., *The EBV-hybridoma technique and its application to human lung cancer*". En, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Volumen 27, Reisfeld y Sell, eds., p. 77-96, Alan R. Liss, Inc., Nueva York, N.Y., (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)).

Fragmento de anticuerpo como se usa en la presente memoria incluye fragmentos F(ab')₂, Fab', y Fab, incluyendo fragmentos híbridos. Tales fragmentos de los anticuerpos retienen la capacidad para unirse a un polipéptido de PhtD específico. Se pueden usar métodos para construir librerías de expresión (ab) (véase, por ejemplo, Huse, et al., 1989 *Science* 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos F(ab) monoclonales con la especificidad deseada por un polipéptido de PhtD. Los fragmentos de anticuerpos que contienen los idiotipos frente al polipéptido se pueden producir mediante técnicas conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a: (i) un fragmento F(ab')₂ producido mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado reduciendo los puentes de disulfuro de un fragmento F(ab')₂; (iii) un fragmento F(ab) generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor; y (iv) fragmentos F(v).

Se describen en la presente memoria composiciones que comprenden un polipéptido inmunógeno de PhtD y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la composición comprende además un adyuvante. Las composiciones que comprenden el polipéptido inmunógeno pueden contener combinaciones de otros polipéptidos inmunógenos, incluyendo, por ejemplo, un polipéptido inmunógeno de *Streptococcus* o fragmentos inmunógenos de PspA, NanA, PsaA, pneumolisina, PspC, o cualquier combinación de los mismos.

Opcionalmente, las composiciones descritas en la presente memoria son adecuadas para la administración a una superficie mucosa. La composición puede ser una pulverización nasal, una disolución nebulizadora, o un inhalante de aerosol, por ejemplo. De este modo, la composición puede estar presente en un recipiente, y el recipiente puede ser un pulverizador nasal, un nebulizador, o un inhalador.

Por vehículo farmacéuticamente aceptable se quiere decir un material que no es biológicamente indeseable o de otro modo indeseable, es decir, el material se puede administrar a un sujeto, junto con el fragmento inmunógeno de PhtD, sin provocar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de manera perniciosa con ninguno de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo se seleccionaría naturalmente para minimizar cualquier degradación del principio activo y minimizar cualesquiera efectos secundarios adversos en el sujeto, como sería bien conocido por un experto en la materia.

Los vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21ª Edición, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005). Típicamente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer a la formulación isotónica. Los ejemplos de los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua estéril, disolución salina, disoluciones tamponadas como disolución de Ringer, y disolución de dextrosa. El pH de la disolución es generalmente de alrededor de 5 a alrededor de 8, o de alrededor de 7 a alrededor de 7,5. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen los polipéptidos inmunógenos de PhtD. Las matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas, liposomas o micropartículas. Resulta evidente para los expertos en la materia que ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y concentración de la composición que se

administra. Los vehículos son aquellos adecuados para la administración de fragmentos inmunógenos de PhtD a seres humanos u otros sujetos.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos, adyuvantes, inmunoestimulantes, además del polipéptido inmunógeno. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más principios activos tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios y anestésicos. También se pueden incluir adyuvantes para estimular o potenciar la respuesta inmunitaria frente a PhtD. Los ejemplos no limitantes de clases adecuadas de adyuvantes incluyen aquellos del tipo gel (es decir, hidróxido/fosfato de aluminio ("adyuvantes de alumbre"), fosfato de calcio, origen microbiano (dipéptido muramílico (MDP)), exotoxinas bacterianas (toxina del cólera (CT), subunidad B de la toxina del cólera nativa (CTB), toxina lábil de *E. coli* (LT), toxina de pertussis (PT), oligonucleótidos CpG, secuencias BCG, toxoide del tétano, monofosforil lípido A (MPL) de, por ejemplo, *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium*, o *Shigella exseri*), adyuvantes en partículas (microesferas biodegradables poliméricas), complejos inmunoestimulantes (ISCOMs)), emulsión de aceite y adyuvantes a base de tensioactivos (adyuvante incompleto de Freund (FIA), emulsiones microfluidizadas (MF59, SAF), saponinas (QS-21)), sintéticos (derivados peptídicos de muramilo (murabutida, treoni-MDP), copolímeros de bloques no iónicos (L121), polifosfaceno (PCCP), polinucleótidos sintéticos (poly A :U, poly I:C), derivados de talidomida (CC-4407/ACTIMID)), ligando RH3, o microesferas de polilactida glicolida (PLGA), entre otros. También son adecuados los fragmentos, homólogos, derivados y fusiones de cualquiera de estas toxinas, con la condición de que retengan actividad adyuvante. Los mutantes o variantes adecuados de los adyuvantes se describen, por ejemplo, en el documento WO 95/17211 (mutante de CT Arg-7-Lys), documento WO 96/6627 (mutante de LT Arg-192-Gly), y documento WO 95/34323 (mutante de PT Arg-9-Lys y Glu-129-Gly). Los mutantes adicionales de LT que se pueden usar en los métodos y composiciones de la invención incluyen, por ejemplo, mutantes Ser-63-Lys, Ala-69-Gly, Glu-110-Asp, y Glu-112-Asp.

Los adyuvantes de sales metálicas tales como adyuvantes de alumbre son bien conocidos en la técnica ya que proporcionan un excipiente seguro con actividad adyuvante. Se piensa que el mecanismo de acción de estos adyuvantes incluye la formación de un depósito antigénico de manera que el antígeno puede estar en el sitio de inyección hasta 3 semanas tras la administración, y también la formación de complejos antígeno/sal metálica, que son recogidos más fácilmente por células que presentan antígenos. Además del aluminio, se han usado otras sales metálicas para adsorber antígenos, incluyendo sales de cinc, calcio, cerio, cromo, hierro, y berilio. Las más comunes son las sales de hidróxido y de fosfato de aluminio. Las formulaciones o composiciones que contienen sales de aluminio, antígeno, y un inmunoestimulante adicional son conocidas en la técnica. Un ejemplo de un inmunoestimulante es el lípido A monofosforilico 3-des-O-acilado (3D-MPL).

Una o más citocinas también pueden ser componentes coestimulantes adecuados en la práctica de la presente invención, ya sea como polipéptidos o codificadas por ácidos nucleicos contenidos en las composiciones de la presente invención (Parmiani, et al. Immunol Lett 2000 Sep 15; 74(1): 41-3; Berzofsky, et al. Nature Immunol. 1: 209-219). Las citocinas adecuadas incluyen, por ejemplo, interleucina-2 (IL-2) (Rosenberg, et al. Nature Med. 4: 321-327 (1998)), IL-4, IL-7, IL-12 (revisado por Pardoll, 1992; Harries, et al. J. Gene Med. 2000 Jul-Aug; 2(4):243-9; Rao, et al. J. Immunol. 156: 3357-3365 (1996)), IL-15 (Xin, et al. Vaccine, 17:858-866, 1999), IL-16 (Cruikshank, et al. J. Leuk Biol. 67(6): 757-66, 2000), IL-18 (J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2001. 127(12): 718-726), GM-CSF (CSF (Disis, et al. Blood, 88: 202-210 (1996)), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), o interferón-gamma (INF- γ). Otras citocinas también pueden ser adecuadas para la práctica de la presente invención, como es conocido en la técnica.

Las quimiocinas también se pueden usar para ayudar a inducir o potenciar la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, se ha demostrado que las proteínas de fusión que comprenden CXCL10 (IP-10) y CCL7 (MCP-3) fusionados a un autoantígeno tumoral inducen inmunidad antitumoral (Biragyn, et al. Nature Biotech. 1999, 17: 253-258). Las quimiocinas CCL3 (MIP-1 α) y CCL5 (RANTES) (Boyer, et al. Vaccine, 1999, 17 (Sup. 2): S53-S64) también pueden ser de uso en la práctica de la presente invención. Otras quimiocinas adecuadas son conocidas en la técnica.

En ciertas formas de realización, el inmunógeno seleccionado como diana se puede utilizar como una molécula de ácido nucleico, ya sea sola o como parte de un vehículo de suministro tal como un vector vírico. En tales casos, puede ser ventajoso combinar el inmunógeno seleccionado como diana con uno o más componentes coestimulantes, tales como proteínas de la superficie celular, citocinas o quimiocinas, en una composición de la presente invención. El componente coestimulante puede estar incluido en la composición como un polipéptido o como un ácido nucleico que codifica el polipéptido, por ejemplo. Las moléculas coestimulantes adecuadas incluyen, por ejemplo, polipéptidos que se unen a miembros de la familia CD28 (es decir, CD28, ICOS; Hutloff, et al. Nature 1999, 397: 263-265; Peach, et al. J Exp Med 1994, 180: 2049-2058) tales como los polipéptidos B7.1 que se unen a CD28 (CD80; Schwartz, 1992; Chen et al, 1992; Ellis, et al. J. Immunol., 156(8): 2700-9) y B7.2 (CD86; Ellis, et al. J. Immunol., 156(8): 2700-9); polipéptidos que se unen a miembros de la familia de integrinas (es decir, LFA-1 (CD11a/CD18); Sedwick, et al. J Immunol 1999, 162: 1367-1375; Wülfing, et al. Science 1998, 282: 2266-2269; Lub, et al. Immunol Today 1995, 16: 479-483) incluyendo miembros de la familia ICAM (es decir, ICAM-1, -2 ó -3); polipéptidos que se unen a miembros de la familia de CD2 (es decir., CD2, molécula de activación linfocítica de señalización (CDw150 o "SLAM"; Aversa, et al. J Immunol 1997, 158: 4036-4044) tal como CD58 (LFA-3; ligando de CD2; Davis, et al. Immunol Today 1996, 17: 177-187) o ligandos de SLAM (Sayos, et al. Nature 1998, 395: 462-469); polipéptidos que se unen a antígeno termoestable (HSA o CD24; Zhou, et al. Eur J Immunol 1997, 27: 2524-2528);

polipéptidos que se unen a miembros de la familia de receptores de TNF (TNFR) (es decir, 4-1BB (CD137; Vinay, et al. Semin Immunol 1998, 10: 481-489), OX40 (CD134; Weinberg, et al. Semin Immunol 1998, 10: 471-480; Higgins, et al. J Immunol 1999, 162: 486-493), y CD27 (Lens, et al. Semin Immunol 1998, 10: 491-499)) tales como 4-1BBL (ligando 4-1BB; Vinay, et al. Semin Immunol 1998, 10: 481-48; DeBenedette, et al. J Immunol 1997, 158: 551-559), factor 1 asociado a TNFR (TRAF-1; ligando 4-1BB; Saoulli, et al. J Exp Med 1998, 187: 1849-1862, Arch, et al. Mol Cell Biol 1998, 18: 558-565), TRAF-2 (ligando 4-1BB y OX40; Saoulli, et al. J Exp Med 1998, 187: 1849-1862; Oshima, et al. Int Immunol 1998, 10: 517-526, Kawamata, et al. J Biol Chem 1998, 273: 5808-5814), TRAF-3 (ligando 4-1 BB y OX40; Arch, et al. Mol Cell Biol 1998, 18: 558-565; Jang, et al. Biochem Biophys Res Commun 1998, 242: 613-620; Kawamata S, et al. J Biol Chem 1998, 273: 5808-5814), OX40L (ligando OX40; Gramaglia, et al. J Immunol 1998, 161: 6510-6517), TRAF-5 (ligando OX40; Arch, et al. Mol Cell Biol 1998, 18: 558-565; Kawamata, et al. J Biol Chem 1998, 273: 5808-5814), y CD70 (ligando CD27; Couderc, et al. Cancer Gene Ther., 5(3): 163-75). También puede ser adecuado CD154 (ligando CD40 o "CD40L"; Gurunathan, et al. J. Immunol., 1998, 161: 4563-4571; Sine, et al. Hum. Gene Ther., 2001, 12: 1091-1102). Los motivos estimulantes distintos de moléculas coestimulantes *per se* se pueden incorporar en ácidos nucleicos que codifican TAs, tales como motivos CpG (Gurunathan, et al. Ann. Rev. Immunol., 2000, 18: 927-974). Estos reactivos y métodos, así como otros conocidos por los expertos en la materia, se pueden utilizar en la práctica de la presente invención.

Otros ejemplos de adyuvantes biológicamente activos, sustancialmente no tóxicos, de la presente invención incluyen hormonas, enzimas, factores de crecimiento, o sus porciones biológicamente activas. Tales hormonas, enzimas, factores de crecimiento, o sus porciones biológicamente activas pueden ser de origen humano, bovino, porcino, ovino, canino, felino, equino, o aviar, por ejemplo, y pueden ser factor de necrosis tumoral (TNF), prolactina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1), somatotropina (hormona del crecimiento) o insulina, o cualquier otra hormona o factor de crecimiento cuyo receptor se expresa en células del sistema inmunitario.

Se proporcionan métodos para obtener y usar los polipéptidos inmunógenos descritos aquí, y composiciones útiles en tales métodos. Los polipéptidos se pueden generar usando técnicas de biología molecular estándar y sistemas de expresión. (Véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Tercera Edición de Sambrook et al., Cold Spring Harbor Press, 2001). Por ejemplo, se puede aislar un fragmento de un gen que codifica un polipéptido inmunógeno, y el polinucleótido que codifica el polipéptido inmunógeno se puede clonar en cualquier vector de expresión comercialmente disponible (tales como los vectores pBR322 y pUC (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA)) o vectores de expresión/purificación (tales como vectores de fusión de GST (Pfizer, Inc., Piscataway, N.J.)), y después se puede expresar en un hospedante procariota, vírico o eucariota adecuado. La purificación se puede lograr entonces por medios convencionales o, en el caso de un sistema de expresión/purificación comercial, según instrucciones del fabricante.

Se proporcionan métodos para detectar la expresión de PhtD para diferenciar neumonía neumocócica de otras formas de neumonía. El reservorio principal de los neumococos en el mundo reside en el transporte nasal de seres humanos. La adquisición de la infección es generalmente a partir de un portador, y la infección está siempre precedida por el transporte nasal. La colonización de la nasofaringe se considera un requisito previo para la diseminación de los neumococos al aparato respiratorio inferior, los senos nasales, y el oído medio.

Para determinar la eficacia de las vacunas neumocócicas es necesario conocer qué sujetos tienen neumonía neumocócica y quienes no. El procedimiento estándar para diagnosticar neumonía es mediante rayos X u otro diagnóstico, y un cultivo sanguíneo positivo para *Streptococcus pneumoniae*. Se supone que los sujetos que satisfacen estos criterios tienen neumonía neumocócica. Desafortunadamente, este método pierde entre 75 y 85 por ciento de pacientes con neumonía neumocócica, debido a que se ha estimado que sólo 15-25% de los pacientes con neumonía también tienen bacteremia (Fedson, et al., Vaccine 17: Supl. 1:S11-18 (1999); Ostergaard y Andersen, Chest 104:1400-1407 (1993)). Un enfoque para resolver este problema ha sido usar ensayos de detección de antígenos, que detectan un polisacárido de la pared celular en la orina. Este ensayo es mucho más sensible, pero desafortunadamente tiene falsos positivos en 12% de adultos y hasta 60% de niños. Esto es debido a que la diana del ensayo está presente algunas veces en la orina debido a la colonización nasal con neumococos en pacientes sin enfermedad neumocócica en sus pulmones o sangre. De este modo, también se proporcionan en la presente memoria métodos para detectar neumonía neumocócica en un sujeto, que comprenden detectar en una muestra procedente del sujeto la presencia de PhtD, en el que la presencia de PhtD indica bacterias neumocócicas en el sujeto. Las concentraciones de PhtD se pueden evaluar en muestra biológica tal como un fluido corporal mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Los fluidos corporales adecuados para uso en los métodos incluyen, pero no se limitan a, sangre, suero, moco y orina.

También se describe aquí un método para reducir el riesgo de una infección neumocócica en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un fragmento inmunógeno de PhtD, o un derivado o variante del mismo. Las infecciones neumocócicas incluyen, por ejemplo, meningitis, otitis media, neumonía, septicemia, o uremia hemolítica. De este modo, el riesgo de una cualquiera o más de estas infecciones se puede reducir mediante los métodos descritos aquí.

Las composiciones que comprenden un polipéptido de PhtD se pueden administrar oralmente, parenteralmente (por ejemplo, intravenosamente), intramuscularmente, intraperitonealmente, transdérmicamente o tópicamente, incluyendo la administración intranasal o la administración a cualquier parte del sistema respiratorio. Como se usa aquí, la administración al sistema respiratorio significa el suministro de las composiciones en la nariz y conductos nasales a través de una o ambas fosas nasales o a través de la boca, incluyendo el suministro mediante un mecanismo de pulverización o mecanismo de goteo, a través de aerosolización o intubación.

La cantidad exacta de las composiciones y polipéptido de PhtD requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, del polipéptido usado, y su modo de administración. De este modo, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición. Sin embargo, una cantidad apropiada se puede determinar por un experto normal en la técnica dada la descripción aquí. Además, se pueden usar múltiples dosis del polipéptido de PhtD, incluyendo, por ejemplo, en un régimen de administración combinada.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos" incluye anticuerpos completos o fragmentados, en forma no purificada o parcialmente purificada (es decir, sobrenadante de hibridoma, ascitis, antisuero policlonal) o en forma purificada. Un anticuerpo "purificado" es aquel que se separa de al menos alrededor de 50% de las proteínas con las que se encuentra inicialmente (es decir, como parte de un sobrenadante de hibridoma o preparación ascítica). Preferiblemente, un anticuerpo purificado se separa de al menos alrededor de 60%, 75%, 90%, o 95% de las proteínas con las que se encuentra inicialmente. Los derivados adecuados pueden incluir fragmentos (es decir, Fab, Fab₂ o anticuerpos monocatenarios (por ejemplo Fv)), como se conoce en la técnica. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen o forma adecuado, incluyendo, por ejemplo, murinos (es decir, producidos por células de hibridoma murinas), o se pueden expresar como anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, y similar.

Los métodos para preparar y utilizar diversos tipos de anticuerpos son bien conocidos por los expertos en la materia, y serían adecuados en la práctica de la presente invención (véase, por ejemplo, Harlow, et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Harlow, et al. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Portable Protocol No. 1, 1998; Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975); Jones et al. *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al. *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988); Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991); Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991); Marks et al., *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995); así como también las patentes U.S. n^{os} 4.816.567; 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016). En ciertas aplicaciones, los anticuerpos pueden estar contenidos en el sobrenadante de hibridoma o fluido ascítico, y se pueden utilizar directamente como tales o tras la concentración usando técnicas estándar. En otras aplicaciones, los anticuerpos se pueden purificar adicionalmente usando, por ejemplo, fraccionamiento salino y cromatografía de intercambio iónico, o cromatografía de afinidad usando ligandos de Proteína A, Proteína G, Proteína A/G, y/o Proteína L acoplados covalentemente a un soporte sólido tal como perlas de agarosa, o combinaciones de estas técnicas. Los anticuerpos se pueden almacenar en cualquier formato adecuado, incluyendo como una preparación congelada (es decir, -20°C o -70°C), en forma liofilizada, o en condiciones de refrigeración normales (es decir, 4°C). Cuando se almacenan en forma líquida, se prefiere utilizar un tampón adecuado, tal como disolución salina tamponada con Tris (TBS) o disolución salina tamponada con fosfato (PBS).

Los anticuerpos ejemplificativos incluyen los anticuerpos monoclonales IB12 producido por el hibridoma de ratón depositado en XXXXX en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, U.S.A. bajo las provisiones del Tratado de Budapest para el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismo para los Fines de Procedimiento de Patente, y según la Designación de Depósito de Patente XXXXX; 4D5, producido por el hibridoma de ratón depositado en XXXXX en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, U.S.A. bajo las provisiones del Tratado de Budapest para el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismo para los Fines de Procedimiento de Patente, y según la Designación de Depósito de Patente XXXXX; y 9E11, producido por el hibridoma de ratón depositado en XXXXX en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, U.S.A. bajo las provisiones del Tratado de Budapest para el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismo para los Fines de Procedimiento de Patente, y según la Designación de Depósito de Patente XXXXX. También se contemplan, por ejemplo, otros anticuerpos, incluyendo fluidos ascíticos, antiseros policlonales u otras preparaciones que contienen tales anticuerpos.

Las preparaciones que incluyen tales anticuerpos pueden incluir anticuerpo no purificado como se encuentra en un sobrenadante de hibridoma o preparación ascítica, preparaciones parcialmente purificadas, o preparaciones purificadas. De este modo, se proporcionan en la presente memoria preparaciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos purificados hasta una pureza de alrededor de 50%, 60%, 75%, 90%, o 95%. Típicamente, tales preparaciones incluyen un tampón, tal como disolución salina tamponada con fosfato o con Tris (PBS o TBS, respectivamente). También se proporcionan derivados de tales anticuerpos, incluyendo fragmentos (Fab, Fab₂ o anticuerpos monocatenarios (por ejemplo Fv)), anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos

humanos, y similares. Los genes que codifican los segmentos variables e hipervariables de los anticuerpos también se pueden aislar de los hibridomas que expresan los mismos clonados en vectores de expresión para producir ciertas preparaciones de anticuerpos (es decir, anticuerpos humanizados). Los métodos para producir tales preparaciones son bien conocidos en la técnica.

El experto conoce muchas técnicas adecuadas para usar los anticuerpos descritos aquí para identificar muestras biológicas que contienen proteínas que se unen a ellos. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden utilizar para aislar proteína PhtD usando, por ejemplo, inmunoprecipitación u otro ensayo de tipo captura. Esta técnica bien conocida se lleva a cabo uniendo el anticuerpo a un soporte sólido o material cromatográfico (es decir, una perla revestida con Proteína A, Proteína G, y/o Proteína L). El anticuerpo unido se introduce entonces en una disolución que contiene o se cree que contiene la proteína PhtD. La proteína PhtD se une entonces al anticuerpo, y los materiales que no se unen se eliminan por lavado en condiciones en las que la proteína PhtD permanece unida al anticuerpo. La proteína unida se puede separar entonces del anticuerpo y analizar como se desee. Los métodos similares para aislar una proteína usando un anticuerpo son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos también se pueden utilizar para detectar proteína PhtD en una muestra biológica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden usar en ensayos tales como, por ejemplo, análisis citométrico de flujo, ELISA, inmunotransferencia (es decir, transferencia Western), detección *in situ*, inmunocitoquímica, y/o inmunohistoquímica. Los métodos para llevar a cabo tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Para ayudar al experto en el uso de los anticuerpos, los mismos se pueden proporcionar en formato de kit. Se describe un kit que incluye 1B12, 4D5, y/o 9E11, que incluye opcionalmente otros componentes necesarios para usar los anticuerpos para detectar células que expresan PhtD. Los anticuerpos del kit se pueden proporcionar en cualquier forma adecuada, incluyendo congelada, liofilizada, o en un tampón farmacéuticamente aceptable tal como TBS o PBS. El kit también puede incluir otros reactivos requeridos para la utilización de los anticuerpos *in vitro* o *in vivo*, tales como tampones (es decir, TBS, PBS), agentes de bloqueo (disoluciones que incluyen leche deshidratada desnatada, suero normal, detergente Tween-20, BSA, o caseína), y/o reactivos de detección (es decir, biotina con anti-IgG de ratón de cabra, conjugados de estreptavidina-HRP, alofocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, peroxidasa, flúor (es decir, DyLight, Cy3, Cy5, FITC, HiLyte Fluor 555, HiLyte Fluor 647), y/o kits de tinción (es decir, ABC Staining Kit, Pierce)). Los kits también pueden incluir otros reactivos y/o instrucciones para usar los anticuerpos en ensayos utilizados normalmente descritos anteriormente, tales como, por ejemplo, análisis de citometría de flujo, ELISA, inmunotransferencia (es decir, transferencia Western), detección *in situ*, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica.

El kit puede proporcionar anticuerpos en forma purificada. Los anticuerpos se pueden proporcionar en forma biotinilada, ya sea solos o junto con un reactivo de detección conjugado con avidina (es decir, anticuerpo). El kit puede incluir un anticuerpo marcado fluorescentemente que se puede usar para detectar directamente la proteína PhtD. Los tampones y similares requeridos para usar cualquiera de estos sistemas son bien conocidos en la técnica, y se pueden preparar por el usuario final o se pueden proporcionar como un componente del kit. El kit también puede incluir un soporte sólido que contiene muestras proteicas y/o de tejidos de control positivo y negativo. Por ejemplo, los kits para llevar a cabo el manchado o ensayos de tipo transferencia Western pueden incluir lisados celulares o tisulares de control para uso en SDS-PAGE o membranas de nailon u otras membranas que contienen muestras de control prefijadas con espacio adicional para muestras experimentales. Los kits para la visualización de PhtD en células sobre portaobjetos pueden incluir portaobjetos previamente formateados que contienen muestras celulares o tisulares de control con espacio adicional para muestras experimentales.

Los anticuerpos y/o sus derivados también se pueden incorporar en composiciones de la invención para uso *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos o sus derivados también se pueden conjugar a restos funcionales tales como fármacos citotóxicos o toxinas, o sus fragmentos activos tales como la cadena de la difteria A, cadena de exotoxina A, cadena de ricina A, cadena de abrina A, curcina, crotina, fenomicina, enomicina, entre otros. Los restos funcionales también pueden incluir compuestos radioquímicos.

También es posible usar los anticuerpos descritos en la presente memoria como reactivos en ensayos de cribado de fármacos. Los reactivos se pueden usar para averiguar el efecto de un candidato farmacéutico sobre la presencia de bacterias *Streptococcus sp.* en una muestra biológica de un paciente, por ejemplo. La técnica de formación del perfil de expresión se puede combinar con técnicas de cribado de alto rendimiento para permitir la identificación rápida de compuestos útiles y monitorizar la eficacia de tratamiento con un candidato farmacéutico (véase, por ejemplo, Zlokarnik, et al., Science 279, 84-8 (1998)). Los candidatos farmacéuticos pueden ser compuestos químicos, ácidos nucleicos, proteínas, anticuerpos, o derivados de ellos, ya sea de origen natural o derivados sintéticamente. Los candidatos farmacéuticos así identificados se pueden utilizar, entre otros usos, como composiciones farmacéuticas para la administración a pacientes o para uso en ensayos de cribado adicionales.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden preparar como preparación inyectable, tal como en suspensión en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable, no tóxico. Los vehículos y disolventes adecuados que se pueden utilizar incluyen agua, disolución de Ringer, y disolución isotónica de cloruro de sodio, TBS y PBS, entre otros. En ciertas aplicaciones, los anticuerpos son adecuados para uso *in vitro*. En otras aplicaciones, los anticuerpos son adecuados para uso *in vivo*. Las preparaciones adecuadas para uso en cualquier caso son bien conocidas en la técnica, y variarán dependiendo de la aplicación particular.

Se debe señalar que, como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales, excepto que el contexto dicte claramente otra cosa. De este modo, por ejemplo, la referencia a un fragmento antigénico incluye mezclas de fragmentos antigénicos, la referencia a un vehículo o adyuvante farmacéutico incluye mezclas de dos o más de tales vehículos o adyuvantes.

Como se usa en la presente memoria, un sujeto o un hospedante significa un individuo. El sujeto puede incluir animales domesticados, tales como gatos y perros, ganado (por ejemplo, ganado vacuno, caballos, cerdos, ovejas, y cabras), animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, cobayas) y pájaros. En un aspecto, el sujeto es un mamífero tal como un primate o un ser humano.

Opcional u opcionalmente significa que el suceso o circunstancia descrito subsiguientemente puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que el suceso o circunstancia ocurre y casos en los que no. Por ejemplo, la frase “opcionalmente la composición puede comprender una combinación” significa que la composición puede comprender una combinación de diferentes moléculas o puede no incluir una combinación, de manera que la descripción incluye tanto la combinación como la ausencia de la combinación (es decir, miembros individuales de la combinación).

Los intervalos se pueden expresar en la presente memoria como desde aproximadamente un valor particular, y/o hasta aproximadamente otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otro aspecto incluye desde el un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante uso del precedente aproximadamente, se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final como independientemente del otro punto final.

Cuando los términos prevenir, que previene, y prevención se usan en la presente memoria en relación con un tratamiento dado para una afección dada (por ejemplo, prevenir infección por *Streptococcus* sp.), significa dar a entender que el paciente tratado no desarrolla en absoluto un nivel clínicamente observable de la afección, o lo desarrolla más lentamente y/o en un menor grado que si no tuviese tratamiento. Estos términos no están limitados solamente a una situación en la que el paciente no experimenta en absoluto ningún aspecto de la afección. Por ejemplo, se afirmará que un tratamiento ha evitado la condición si se da durante la exposición de un paciente a un estímulo que habría sido de esperar que produjese una manifestación dada de la afección, y da como resultado que el paciente experimente menores síntomas y/o síntomas más suaves de la condición que lo esperado de otro modo. Un tratamiento puede “prevenir” la infección al dar como resultado que el paciente sólo presente síntomas evidentes leves de la infección; no implica que no debe haberse producido penetración de alguna célula por el microorganismo infectante.

De forma similar, reducir, que reduce, y reducción, como se usan aquí en relación con el riesgo de infección con un tratamiento dado (por ejemplo, reducir el riesgo de una infección neumocócica), se refiere a que un sujeto desarrolle una infección más lentamente o en menor grado en comparación con un nivel de control o basal de desarrollo de una infección en ausencia de un tratamiento (por ejemplo, administración de un polipéptido inmunógeno). Una reducción en el riesgo de infección puede dar como resultado que el paciente presente sólo síntomas evidentes leves de la infección o síntomas retrasados de la infección; no implica que no debe haber habido penetración de alguna célula por el microorganismo infectante.

En los siguientes ejemplos no limitativos se proporcionan otras formas de realización y caracterizaciones de la presente invención.

Ejemplos

La descripción anterior describe generalmente la presente invención. Se puede obtener una comprensión más completa haciendo referencia a los siguientes Ejemplos específicos. Estos Ejemplos se describen solamente con fines ilustrativos, no pretenden limitar el alcance de la invención. Se contemplan cambios en forma y sustitución de equivalentes a medida que las circunstancias puedan sugerirlo o se crea oportuno. Aunque se han empleado en la presente memoria términos específicos, tales términos están destinados a un sentido descriptivo y no con fines de limitación.

Se proporcionan en la presente memoria, en una forma de realización de la invención, polipéptidos de PhtD truncados de la cepa 14453 de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6 depositada el 27 de julio de 1997 como ATCC 55987 y/o que tiene la secuencia como se expone en SEC ID NO.1. Los truncamientos de PhtD descritos en esta invención comprenden regiones de la proteína que son tanto similares como disímiles a las regiones en PhtB, y de este modo contienen epítomos potenciales reactivos cruzados y únicos, respectivamente. Las proteínas truncadas se expresan en *Escherichia coli* como derivados recombinantes marcados con His para facilitar la purificación, y se purifican subsiguientemente usando cromatografía de afinidad de Ni²⁺-NTA.

Ejemplo 1

Clonación y producción de proteínas truncadas PhtD recombinantes.

5 Este ejemplo describe la clonación de versiones truncadas de *phtD* procedentes de la cepa 14453 de *Streptococcus pneumoniae* serotipo 6 en el plásmido pET28a(+), de manera que el producto expresado tiene un marcador 6xHis N-terminal. Las formas truncadas de PhtD también se pueden expresar sin el marcador 6xHis N-terminal como se ilustra en las SEC ID NOS. 2, 3 y 4 (proteína) así como SEC ID NOS. 5, 7 y 9 (ADN).

10 En la Tabla 3 se muestran los cebadores usados para amplificar las secuencias descritas en la presente memoria:

Tabla 3	
Cebadores PCR	
Nombre/número de cebador	Secuencia 5' - 3', sitios de restricción subrayados
Spn0215	CTAGCCATGGGACATCATCATCATCACTGGGTACCAGATTCAAGACCAG (SEC ID NO. 11)
Spn0216	CTAGCCATGGGACATCATCATCATCACGTCAAGTACTATGTCGAACATCC (SEC ID NO. 12)
Spn0217	CTAGCCATGGGACATCATCATCATCACCATGTTTCGTAAAAATAAGGTAGAC (SEC ID NO. 13)
Spn0176	TGGCCTCGAGTTACTACTGTATAGGAGCCGGTT (SEC ID NO 14)

Truncamiento # 1

15 De forma breve, el gen *phtD* T1 se amplificó mediante PCR a partir del genoma de la cepa 14453 de *S. pneumoniae* serotipo 6 usando High Fidelity Advantage 2 polymerase (BD). Los cebadores de PCR Spn0215 y Spn0176 introdujeron los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3', respectivamente (véase la Tabla 3). El cebador de 5', Spn0215, también introdujo el marcador His N-terminal. El producto de la PCR se purificó usando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen), y se hizo pasar subsiguientemente sobre un gel de agarosa para la purificación usando el kit de extracción en gel QIAEX (Qiagen). El producto de la PCR y el vector pET28a(+) (Novagen) se digirieron ambos con *NcoI* y *XhoI*, y se purificaron subsiguientemente en un gel de agarosa usando el kit de extracción en gel QIAEX (Qiagen). El vector digerido y el gen se ligaron entonces juntos usando una T4 ADN ligasa (Invitrogen). La mezcla de ligación se transformó en DH5 α de *E. coli* químicamente competente, y los clones positivos se seleccionaron sembrando en placa sobre agar Luria que contiene 50 μ g/ml de kanamicina. Se escogieron cuatro colonias por constructo, y se aisló ADN plasmídico usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Se llevaron a cabo digestiones con *NcoI/XhoI* para determinar qué clones tuvieron el tamaño correcto de fragmentos. Los cuatro clones fueron correctos según el análisis de restricción, y entonces se aisló ADN Midiprep a partir de un clon positivo (#1) usando el kit QIAfilter Plasmid Midi (Qiagen) y se secuenció el ADN para asegurar que no se introdujeron artefactos de clonación. Este clon se denominó pBAC30.

La PhtD T1 se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) a un nivel elevado, como se observa mediante una banda intensa del tamaño correcto de aproximadamente 56,1 kDa en un gel de SDS-PAGE. La expresión proteica se indujo durante 2 horas con 1 mM de IPTG.

Truncamiento # 2

El gen *phtD* T2 también se amplificó mediante PCR a partir del genoma de la cepa 14453 de *S. pneumoniae* serotipo 6 usando High Fidelity Advantage 2 polymerase (BD). Los cebadores de PCR Spn0216 y Spn0176 introdujeron los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3', respectivamente (véase la Tabla 3). El cebador de 5', Spn0216, también introdujo el marcador His N-terminal. El producto de la PCR se purificó usando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen), y se hizo pasar subsiguientemente sobre un gel de agarosa para la purificación usando el kit de extracción en gel QIAEX (Qiagen). El producto de la PCR y el vector pET28a(+) (Novagen) se digirieron ambos con *NcoI* y *XhoI*, y se purificaron subsiguientemente en un gel de agarosa usando el kit de extracción en gel QIAEX (Qiagen). El vector digerido y el gen se ligaron entonces juntos usando una T4 ADN ligasa (Invitrogen). La mezcla de ligación se transformó en DH5 α de *E. coli* químicamente competente, y los clones positivos se seleccionaron sembrando en placa sobre agar Luria que contiene 50 μ g/ml de kanamicina. Se aisló ADN plasmídico a partir de los clones seleccionados usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Se llevaron a cabo digestiones con *NcoI/XhoI* para determinar qué clones tuvieron el tamaño correcto de fragmentos. Entonces se aisló ADN Midiprep a partir de un clon positivo usando el kit QIAfilter Plasmid Midi (Qiagen) y se secuenció para asegurar que no se introdujeron artefactos de clonación. Este clon se denominó pBAC31.

La PhtD T2 se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) a un nivel elevado, como se observa mediante una banda intensa que aparece a aproximadamente 19,3 kDa en un gel de SDS-PAGE. La expresión proteica se indujo durante 2 horas con 1 mM de IPTG.

Truncamiento # 3

El gen *phtD* T3 también se amplificó mediante PCR a partir del genoma de la cepa 14453 de *S. pneumoniae* serotipo 6 usando High Fidelity Advantage 2 polymerase (BD). Spn0217 y Spn0176 introdujeron los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3', respectivamente (véase la Tabla 3). El cebador de 5', Spn0217, también introdujo el marcador 6xHis N-terminal. El producto de la PCR se purificó usando un kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen), y se hizo pasar subsiguientemente sobre un gel de agarosa para la purificación usando el kit de extracción en gel QIAEX (Qiagen). El producto de la PCR y el vector pET28a(+) (Novagen) se digirieron ambos con *NcoI* y *XhoI*, y se purificaron subsiguientemente en un gel de agarosa usando el kit de extracción en gel QIAEX (Qiagen). El vector digerido y el gen se ligaron entonces juntos usando una T4 ADN ligasa (Invitrogen). La mezcla de ligación se transformó en DH5 α de *E. coli* químicamente competente, y los clones positivos se seleccionaron sembrando en placa sobre agar Luria que contiene 50 μ g/ml de kanamicina. Se escogieron las colonias y se aisló ADN plasmídico usando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Se llevaron a cabo digestiones con *NcoI/XhoI* para determinar qué clones tuvieron el tamaño correcto de fragmentos. Entonces se aisló ADN Midiprep a partir de un clon positivo usando el kit QIAfilter Plasmid Midi (Qiagen) y se secuenció para asegurar que no se introdujeron artefactos de clonación. Este clon se denominó pBAC32.

La PhtD T3 se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) a un nivel elevado, como se observa mediante una banda intensa que aparece a aproximadamente 16,7 kDa en un gel de SDS-PAGE. La expresión proteica se indujo durante 2 horas con 1 mM de IPTG.

Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos truncados se muestran más abajo:

Truncamiento 1 de PhtD que incluye el marcador His (subrayado) expresado a partir de pBAC30:

MGHHHHHHWVPDSRPEQPSPQSTPEPSPSPQAPNPQPAPSNPIDEKLVKEAVRKVG DGYVF
EENGVSRYIPAKDL~~SAETAAGIDSKLAKQESLSHKL~~GAKKTDLPSSDREFYNKAYDLLARIH
QDLLDNKGRQVD~~FEALDNLLERLKD~~VPSDKVKLVDDILAF~~LAPIR~~HPERLGKPN~~AQITYT~~DD
EIQVAKLAGKYTTEDGYIFDPRDITSDEGDAYVTPHMTSHWIKKDSLSEAERAAAQAYAKE
KGLTPPSTDHQDSGNT~~EAKGAEAI~~YNRVKAAK~~KVPLDR~~MPYNLQYTVEVKNGSLIIPHYDHY
HNIKFEWFDEGLYEAPKGYTLEDLLATVKY~~VEHPNERPHSD~~NGFGNASDHVRKNKVDQDSK
PDEDKEHDEVSEPTHPESDEKENHAGLNPSADNLYKPSTDT~~EETEEEE~~AEDTTDEAEIPQVEN
SVINAKIADAEAL~~LEKVT~~DPSIRQNAME~~TLTGLKSS~~LLLGTKDNNTISAEVDSLLALLKESQ
PAPIQ (SEC ID nº 15)

Truncamiento 2 de PhtD que incluye el marcador His (subrayado) expresado a partir de pBAC31:

MGHHHHHHVKYYVEHPNERPHSDNGFGNASDHVRKNKVDQDSKPDEDKEHDEVSEPTHPESD
EKENHAGLNPSADNLYKPSTDT~~EETEEEE~~AEDTTDEAEIPQVENSVINAKIADAEAL~~LEKVT~~D
PSIRQNAME~~TLTGLKSS~~LLLGTKDNNTISAEVDSLLALLKESQPAPIQ (SEC ID nº 16)

Truncamiento 3 de PhtD que incluye el marcador His (subrayado) expresado a partir de pBAC32:

MGHHHHHHHVRKNKVDQDSKPDEDKEHDEVSEPTHPESDEKENHAGLNPSADNLYKPSTDT~~E~~
~~EETEEEE~~AEDTTDEAEIPQVENSVINAKIADAEAL~~LEKVT~~DPSIRQNAME~~TLTGLKSS~~LLLGTK
DNNTISAEVDSLLALLKESQPAPIQ (SEC ID nº 17)

Caracterización estructural de truncamientos de PhtD y comparación con PhtD de longitud completa

Los truncamientos 1, 2 y 3 de PhtD purificados se caracterizaron cada uno por medios bioquímicos y biofísicos, y los resultados obtenidos se compararon con datos de caracterización obtenidos a partir del análisis de lotes de proteína PhtD de longitud completa (que carece de secuencia señal). Se llevaron a cabo los siguientes ensayos: espectroscopía de dicroísmo circular (CD), espectroscopía de fluorescencia intrínseca, ultracentrifugación analítica (AUC), cromatografía de exclusión molecular con detección de dispersión de la luz de múltiples ángulos (SEC-MALS), y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los resultados de estos análisis se resumen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4: Sumario de resultados de caracterización para PhtD y truncamientos de PhtD

Ensayo	PhtD de longitud completa	PhtD Truncamiento 1	PhtD Truncamiento 2	PhtD Truncamiento 3
Espectroscopía de CD	Estructura secundaria mixta de hélice α /lámina β	Estructura secundaria mixta de hélice α /lámina β	Estructura secundaria principalmente de hélice α	Estructura secundaria principalmente de hélice α
Espectroscopía de fluorescencia	Emisión máx = 347-349 nm*	Emisión máx = 349 nm*	No determinada debido a baja señal	No determinada debido a baja señal
AUC	Estructura monomérica en disolución muy extendida	Estructura monomérica en disolución extendida	Estructura monomérica en disolución compacta	Estructura monomérica en disolución compacta
SEC-MALS	Monomérico	Monomérico	Monomérico	Monomérico
DSC	3 transiciones T_m = 58,0°C, 72,1°C, 89,0°C~	2 transiciones T_m = 62,1°C, 82,8°C	1 transición T_m = 85,3°C	1 transición T_m = 85,5°C
*A frecuencias de excitación 280 nm y 295 nm ~ T_m , punto medio de transición térmica				

Basándose en los resultados de caracterización resumidos en la Tabla 4, el truncamiento de PhtD 1 tiene una estructura en disolución global similar, aunque no idéntica, a PhtD de longitud completa, mientras que las estructuras de los truncamientos 2 y 3 de PhtD son diferentes. Las múltiples transiciones térmicas observadas en el análisis de DSC de PhtD sugieren la presencia de múltiples dominios (es decir, tres). Los resultados de DSC para el truncamiento 1 de PhtD muestran 2 transiciones, sugiriendo que el truncamiento ha eliminado uno de estos dominios. Los truncamientos 2 y 3 de PhtD tienen estructuras globales similares, y los resultados de DSC muestran la presencia de un único dominio que es térmicamente muy estable. Estos resultados muestran que los truncamientos están en una conformación plegada.

Ejemplo 2

Anticuerpos monoclonales

Se generaron anticuerpos monoclonales frente a un número de proteínas Pht (es decir, PhtD, PhtA, PhtB, PhtE) mediante Immuno-Precise (Victoria, BC, Canadá), usando procedimientos estándar. Para generar los anticuerpos monoclonales, se inmunizaron ratones con las diversas proteínas, y los hibridomas que segregan anticuerpos con especificidad se aislaron usando procedimientos estándar. Se generó un número de clones de hibridoma para cada una de PhtD, PhtA, PhtB y PhtE.

Con respecto a PhtD, se inmunizaron ratones con proteína PhtD de longitud completa producida recombinantemente (marcada con his y carente de secuencia señal). La proteína PhtD producida recombinantemente derivó de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae* (depositada en la American Type Culture Collection, ATCC BAA-334). La secuencia de aminoácidos de la proteína PhtD usada para inmunizar los ratones, SEC ID NO: 24, se expone más abajo, y la secuencia nucleotídica correspondiente es SEC ID NO: 23.

Secuencia de la proteína PhtD recombinante:

```
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQMGSSSYELGRHQAGQVKESNRVSYIDGDQAGQKAENLTP
DEVSKREGINAEQIVIKITDQGYVTSBGDHYHYNGKVPYDAIISEELMKDPNYQLKSDIVNEIKGGY
VIKVDGKYVYVLKDAHADNIRTKEEIKRQKQESHSHNHGGSSNDQAVVAARAQGRYTTDDGYIFNASDI
EDTGDYIVPHGDHYHYIPKNELSAELAAAEAYWNGKQGSRPSSSSSYNANPAQPRLSNHNLTVTPTY
HQNGENISSLLRELYAKPLSERHVESDGLIFDPAQITSRTARGVAVPHGNHYHFIPYEQMSELEKRIAR
IIPLYRSNHWPDSRPEQSPQSTPEPSPSPQAPNPQAPSNPIDKLVKEAVRKVGDGYVFEENGVS
RYIPAKDLAETAAGIDSKLAKQESLSHKLGAKKTDLPSSDREFYNKAYDLLARIHQDLLDNKGRQVDFE
ALDNLLERLKDVPSDKVCLVDDILAFAPIRHPERLGKPNQAITYTDDEIQVAKLAGKYTTEDGYIFDPR
DITSDEGDYVTPHMTSHWIKKDSLSEAERAAQAYAKEKGLTPSTDHQDSGNTAEKGAEIYNRVKA
AKKVPLDRMPYNLQYTVEVKNGSLIPHYDHYHNIKFEWFDEGLYAPKGYTLEDLLATVKYVVEHPNER
PHSDNGFGNASDHVRKNKVDQDSKPDDEKHEDEVSEPTHPESDEKENHAGLNPSADNLYKPSTDTEETEE
EAEDTTDEAEIPQVENSVINAKIADAEALLEKVTDPsirQnamETLTGLKSSLLLGTKDNNTISAEVDLSL
LALLKESQPAPIQ (SEC ID nº 24)
```

a. Reactividad cruzada

La reactividad cruzada de cada uno de los anticuerpos monoclonales generados frente a las diferentes proteínas Pht se evaluó mediante ELISA usando sobrenadantes procedentes de los hibridomas. Los resultados del ELISA se exponen a continuación en la Tabla 5. Cada uno de los anticuerpos monoclonales generados (por ejemplo PhtD) se cribó en el ELISA en busca de la reactividad frente a la proteína Pht particular contra la que se provocó (identificada en la Tabla 4 como "Auto") y frente a combinaciones de proteínas Pht (por ejemplo PhtA y PhtE se identifican en la Tabla 5 como "A,E"). El número total de clones de hibridomas generados para cada proteína Pht se señala en la Tabla 5 entre paréntesis bajo la proteína Pht aplicable en la columna "Proteína Inmunizante" (por ejemplo, se generaron 14 clones de hibridomas para PhtD). Las proteínas Pht usadas en el cribado fueron proteínas completas recombinantes.

Tabla 5

Proteína inmunizante	Número de clones específicos para diferentes proteínas Pht								
	Auto	A,E	B,D	B,E	D,E	A,B,D	A,B,E	B,D,E	A,B,D,E
PhtD (14 total)	4	-	3	0	0	6	-	0	1
PhtB (69 total)	9	-	37	0	-	15	0	2	6
PhtA (48 total)	19	-	-	-	-	5	0	-	24
PhtE (72 total)	50	6	-	1	7	-	2	0	6

Basándose en los resultados del cribado de reactividad cruzada (mediante ELISA), se seleccionó un número de anticuerpos para el análisis posterior, incluyendo los clones de hibridomas 9E11, 4D5 y IB12. Mientras que cada uno de los clones 9E11, 4D5 y IB12 se generaron frente a PhtD, se determinó que el clon 9E11 en el cribado de reactividad cruzada tiene especificidad solamente para PhtD, mientras que se encontró que cada uno de los clones 4D5 y IB12 tienen especificidad para PhtA, B y D.

b. Cartografiado epitópico

El cartografiado epitópico se llevó a cabo usando SDS-PAGE desnaturizante/transferencia Western. Se determinó que cada uno de los clones 4D5 y 9E11 producen mAbs que se unen a epítomos lineales del fragmento de truncamiento 3 de PhtD. La digestión proteolítica del fragmento del truncamiento 3 de PhtD, seguido de la transferencia Western, mostró que el epítipo lineal reconocido por mAb de 9E11 se encuentra en una secuencia que corresponde a los aminoácidos 1 a 101 (SEC ID NO:26) del fragmento de truncamiento 3 (y la secuencia de aminoácidos correspondiente de la proteína PhtD de longitud completa). El ensayo posterior de los mAbs de cada clon (es decir, clones 9E11, 4D5 y IB12) mediante ELISA usando truncamientos 1, 2 y 3 de PhtD confirmó la especificidad averiguada para cada clon mediante transferencias Western, e identificó que el clon de mAb (IB12) tiene especificidad por el truncamiento T3.

c. Protección pasiva

En una forma de realización adicional de la presente invención, los mAbs producidos mediante cada uno de los clones 9E11, 4D5 y IB12 se evaluaron en busca de su capacidad para proteger a los animales frente a la exposición con *S. pneumoniae*.

Se llevó a cabo un experimento inicial para ensayar la capacidad de los anticuerpos provocados cada uno en conejos frente a PspA, PhtB o PhtD de longitud completa para proporcionar protección pasiva frente a infección por *S. pneumoniae*. En este estudio, grupos de ratones CBA/n se trataron previamente con una dosis intraperitoneal de suero de conejo anti-PspA, anti-PhtB, o anti-PhtD (diluído 1:10) una hora antes de la administración intravenosa de 50 cfu de la cepa A66.1 de *S. pneumoniae*. Para cada grupo que había sido tratado previamente con anticuerpo (es decir, PspA, PhtB o PhtD), sobrevivió el 100% de los animales. Por el contrario, 1/20 de los animales que habían sido tratados previamente con suero de PspA de conejo previamente extraído sobrevivió, 0/10 de los animales que habían sido tratados previamente con suero de PhtB de conejo previamente sangrado sobrevivió, y 1/25 de los animales que habían sido tratados previamente con suero de PhtD de conejo previamente sangrado sobrevivió.

Los estudios de protección pasiva llevados a cabo utilizó un modelo de protección pasiva desarrollado previamente. El modelo usa ratones CBA/CaHN-Btkid/J, que se sabe que son muy susceptibles a la infección por *S. pneumoniae*, e implica la administración intraperitoneal del anticuerpo bajo estudio una hora antes de la administración intravenosa de 50 cfu de la cepa A66.1 de *S. pneumoniae*. La dosis de exposición administrada se verifica antes y después de la exposición. La mortalidad se monitoriza durante 14 días, y la sangre de los ratones que sobreviven se coloca en placas para confirmar el aclaramiento bacteriano.

En un experimento, los mAbs producidos por los clones 4D5 y 9E11 se ensayaron cada uno usando el modelo de inmunización pasiva. Se usaron grupos de 5 ratones. A tres grupos se les administró intraperitonealmente 400 µg de mAb de 4D5 en disolución salina tamponada con fosfato (PBS), mAb de 9E11 en PBS, o PBS (es decir, grupo de control negativo). Al grupo de control positivo se le administró anti-PhtD de conejo. A cada grupo se le administró una dosis de exposición de 50 cfu de la cepa A66.1 de *S. pneumoniae*. Ochenta por ciento de los animales inmunizados con el mAb producido por el clon 4D5 sobrevivió a la dosis de exposición, y el cien por ciento de los animales inmunizados con mAb producido por 9E11 sobrevivió a la dosis de exposición. Ninguno de los animales sobrevivió tras la “inmunización” con PBS, mientras que el cien por ciento de los animales inmunizados con anti-PhtD de conejo sobrevivió a la dosis de exposición.

En un experimento separado, el mAb de IB12 se ensayó usando el modelo de inmunización pasiva. Se administraron 400 µg de mAb de 1B12 en PBS vía la ruta intraperitoneal, seguido de la administración de una dosis de exposición de 50 cfu de la cepa A66.1 de *S. pneumoniae*. Con respecto al grupo que se había inmunizado con mAb provocado por IB12, el cien por ciento de los animales sobrevivió a la dosis de exposición hasta el día 3 y ochenta por ciento de los animales sobrevivió a la dosis de exposición hasta el día 14 (es decir, los límites del ensayo). Ninguno de los animales en el grupo “inmunizado” con PBS sobrevivió más allá del día 1, mientras que cada uno de los animales en el grupo de control positivo (es decir, inmunizados con suero anti-PhtD de conejo) sobrevivió a la dosis de exposición hasta el día 14.

También se llevaron a cabo estudios de dosificación. Usando el mismo modelo de exposición, los animales se inmunizaron con 400 µg, 200 µg, 100 µg o 50 µg de mAb de 9E11 en PBS una hora antes de la administración de una dosis de exposición de 50 cfu de la cepa A66.1 de *S. pneumoniae*. Al grupo de control negativo se le administró PBS antes de la exposición, y al grupo de control positivo se le administró suero anti-PhtD de conejo (en una dilución 1:10) antes de la exposición. Después de 14 días, el 60% de los ratones sobrevivió tras la dosis de 400 µg; el 20% sobrevivió tras la dosis de 200 µg; y ningún animal sobrevivió tras las dosis de 100 µg o 50 µg. Con respecto al grupo al que se le administró la dosis de 400 µg, la supervivencia cayó hasta 80% en el día 6, y hasta el 60% en el día 9. Con respecto al grupo al que se le administró la dosis de 200 µg, la supervivencia cayó hasta 60% en el día 3, y hasta el 20% en el día 5. Con respecto al grupo al que se le administró la dosis de 100 µg, la supervivencia disminuyó hasta 20% en el día 2 y hasta 0% en el día 3. De este modo, se observó un incremento en la supervivencia de 14 días tanto para el grupo al que se le administró la dosis de 400 µg (supervivencia de 60%) como para el grupo al que se le administró la dosis de 200 µg (20% de supervivencia).

Se llevó a cabo un estudio de dosificación similar usando mAb 4D5. A los animales se les inmunizó con 400 µg, 200 µg, 100 µg o 50 µg de mAb de 4D5 en PBS una hora antes de la administración de la dosis de exposición de 50 cfu de la cepa A66.1 de *S. pneumoniae*. Después de 14 días, el 100% de los ratones sobrevivió tras la dosis de 400 µg, y ninguno sobrevivió a las dosis más bajas o al control (PBS). El cien por cien de los animales sobrevivió hasta el día 2 tras la dosis de 200 µg; el 60% sobrevivió hasta el día 2, y el 20% sobrevivió hasta el día 3. De este modo, se observó un incremento en la supervivencia 14 días tanto en el grupo al que se le administró la dosis de 400 µg (100% de supervivencia) como en el grupo al que se le administró la dosis de 200 µg (20% de supervivencia hasta el día 3).

d. Efecto sinérgico de mAbs

Se llevó a cabo un estudio para ensayar la capacidad de los mAbs para actuar sinérgicamente. Se utilizó el mismo Modelo de Protección Pasiva como en los estudios previos. Se utilizaron ocho grupos de ratones (con 5 en cada uno) y se les administró antes de la dosis de exposición 100 µg mAbs de 4D5, 200 µg mAbs de 4D5, 100 µg mAbs de 9E11, 200 µg mAbs de 9E11, 200 µg de un conjunto que consiste en 100 µg de cada uno de los mAbs de 9E11 y 4D5, PBS (es decir, control negativo), suero de conejo anti-PspA (es decir, control positivo) o 400 µg mAbs de IB12. Se encontró que una dosis total de 200 µg que contiene 100 µg de cada uno de los anticuerpos de 4D5 y 9E11 proporcionó una protección del 100% hasta los 14 días (es decir, los límites del ensayo). Por el contrario, 200 µg de mAbs de 4D5 o 9E11 solos proporcionó solamente 20% y 40% de supervivencia en el día 14, respectivamente. Una dosis de 100 µg de 4D5 proporcionó 100% de supervivencia hasta el día 1 (como lo hizo PBS) y una supervivencia del 60% hasta el día 2, que cayó hasta una supervivencia de 20% en el día 3 (que se sostuvo hasta el día 14). Una dosis de 100 µg de mAb de 9E11 proporcionó una supervivencia del 100% el día 1 (como lo hizo PBS), una supervivencia de 80% hasta el día 2, una supervivencia del 60% hasta el día 3 y una supervivencia del 20% a partir de los días 4-6, que entonces cayó hasta cero. Un experimento subsiguiente, cuyos datos se exponen en la Tabla 6 a continuación, confirmó este efecto sinérgico. En este estudio, a los grupos de animales se les administraron dosis de concentraciones variables del conjunto de mAb (es decir, conjunto de cantidades iguales de mAbs de 9E11 y 4D5).

Tabla 6*

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
PBS	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PspA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
200P	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
100P	100	100	100	80	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
50P	100	100	80	60	40	20	0	0	0	0	0	0	0	0
25P	100	60	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*PBS: disolución salina tamponada con fosfato; PspA: anti-PspA de longitud completa; 200P: 200 µg de conjunto de 4D5 y 9E11; 100P: 100 µg de conjunto de 4D5 y 9E11; 50P: 50 µg de conjunto de 4D5 y 9E11; 25P: 25 µg de conjunto de 4D5 y 9E11.

Como se muestra en la Tabla 6, se observó efecto sinérgico para cada dosis. Aunque la dosis de 25 µg no se ensayó previamente, la dosis reunida de 25 µg proporcionó supervivencia del 20% hasta el día 3. En experimentos previos, una dosis de 50 µg de mAb de 4D5 o 9E11 tuvo esencialmente el mismo resultado como lo tuvo la dosis de PBS (es decir, control negativo).

Estos experimentos demuestran que los mAbs de 4D5 y 9E11 se pueden usar cada uno para proporcionar protección frente a la infección por *S. pneumoniae*. Estos experimentos también demuestran un efecto sinérgico sorprendente que resulta de la dosificación combinada de mAbs 4D5 y 9E11 sobre el efecto aditivo esperado de combinar los anticuerpos individuales. Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria se pueden usar separadamente y en combinación.

Referencias

Adamou JE, Heinrichs JH, Erwin AL, Walsh W, Gayle T, Dormitzer M, Dagan R, Brewah YA, Barren P, Lathigra R, Langermann S, Koenig S, Johnson S. 2001. "Identification and Characterization of a Novel Family of Pneumococcal Proteins That Are Protective against Sepsis." *Infect Immun.* 69:949-958.

Hamel J, Charland N, Pineau I, Ouellet C, Rioux S, Martin D, Brodeur BR. 2004. "Prevention of Pneumococcal Disease in Mice Immunized with Conserved Surface-Accessible Proteins." *Infect Immun.* 72:2659-2670.

Ogunniyi AD, Grabowicz M, Briles DE, Cook J, Paton JC. 2007. "Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*." *Infect Immun.* 75: 350-357.

Zhang Y, Masi AW, Bamiak V, Mountzouros K, Hostetter MK, Green BA. 2001. "Recombinant PhpA protein, a unique histidine motif-containing protein from *Streptococcus pneumoniae*, protects mice against intranasal pneumococcal disease." *Infect Immun.* 69: 3827-3836.

Guilmi, *et al.* New approaches towards the identification of antibiotic and vaccine targets in *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO reports* 3, 8, 728-734 (2002)

Patente US nº 7.122.194. Johnson, *et al.* 17 de octubre de 2006.

Título: Vaccine compositions comprising *Streptococcus pneumoniae* polypeptides having selected structural motifs

Patente US nº 6.582.706. Johnson, *et al.* 4 de junio de 2003.

Título: Vaccine compositions comprising *Streptococcus pneumoniae* polypeptides having selected structural motifs

Solicitud de patente US 20050214329 Laferriere, Craig Anthony Joseph, *et al.* 29 de septiembre de 2005

Título: Vaccine

Solicitud de patente US 20040081662 Hermand, Philippe, *et al.* 29 de abril de 2004

Título: Vaccine

Listado de secuencias

<110> Sanofi Pasteur Ltd.

5 <120> POLIPÉPTIDOS INMUNÓGENOS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES

<130> P100795EP51

<150> 60/961.723

10 <151> 23-07-2007

<160> 26

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 839

<212> PRT

20 <213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 1

Met Lys Ile Asn Lys Lys Tyr Leu Ala Gly Ser val Ala val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Ser val Cys Ser Tyr Glu Leu Gly Arg His Gln Ala Gly Gln val
20 25 30

Lys Lys Glu Ser Asn Arg val Ser Tyr Ile Asp Gly Asp Gln Ala Gly
35 40 45

Gln Lys Ala Glu Asn Leu Thr Pro Asp Glu Val Ser Lys Arg Glu Gly
50 55 60

Ile Asn Ala Glu Gln Ile val Ile Lys Ile Thr Asp Gln Gly Tyr val
65 70 75 80

Thr Ser His Gly Asp His Tyr His Tyr Tyr Asn Gly Lys val Pro Tyr
85 90 95

Asp Ala Ile Ile Ser Glu Glu Leu Leu Met Lys Asp Pro Asn Tyr Gln
100 105 110

Leu Lys Asp Ser Asp Ile val Asn Glu Ile Lys Gly Gly Tyr val Ile
115 120 125

Lys val Asp Gly Lys Tyr Tyr val Tyr Leu Lys Asp Ala Ala His Ala
130 135 140

Asp Asn Ile Arg Thr Lys Glu Glu Ile Lys Arg Gln Lys Gln Glu His
145 150 155 160

Ser His Asn His Gly Gly Gly Ser Asn Asp Gln Ala val val Ala Ala
165 170 175

Arg Ala Gln Gly Arg Tyr Thr Thr Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Asn Ala
180 185 190

Ser Asp Ile Ile Glu Asp Thr Gly Asp Ala Tyr Ile Val Pro His Gly
195 200 205

Asp His Tyr His Tyr Ile Pro Lys Asn Glu Leu Ser Ala Ser Glu Leu
210 215 220

Ala Ala Ala Glu Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Gln Gly Ser Arg Pro Ser
225 230 235 240

Ser Ser Ser Ser Tyr Asn Ala Asn Pro Ala Gln Pro Arg Leu Ser Glu
245 250 255

Asn His Asn Leu Thr Val Thr Pro Thr Tyr His Gln Asn Gln Gly Glu
260 265 270

Asn Ile Ser Ser Leu Leu Arg Glu Leu Tyr Ala Lys Pro Leu Ser Glu
275 280 285

Arg His Val Glu Ser Asp Gly Leu Ile Phe Asp Pro Ala Gln Ile Thr
290 295 300

Ser Arg Thr Ala Arg Gly Val Ala Val Pro His Gly Asn His Tyr His
305 310 315 320

Phe Ile Pro Tyr Glu Gln Met Ser Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ala Arg
325 330 335

Ile Ile Pro Leu Arg Tyr Arg Ser Asn His Trp Val Pro Asp Ser Arg
340 345 350

Pro Glu Gln Pro Ser Pro Gln Ser Thr Pro Glu Pro Ser Pro Ser Pro
355 360 365

Gln Pro Ala Pro Asn Pro Gln Pro Ala Pro Ser Asn Pro Ile Asp Glu
370 375 380

Lys Leu Val Lys Glu Ala Val Arg Lys Val Gly Asp Gly Tyr Val Phe
385 390 395 400

Glu Glu Asn Gly Val Ser Arg Tyr Ile Pro Ala Lys Asp Leu Ser Ala
405 410 415

Glu Thr Ala Ala Gly Ile Asp Ser Lys Leu Ala Lys Gln Glu Ser Leu
420 425 430

Ser His Lys Leu Gly Ala Lys Lys Thr Asp Leu Pro Ser Ser Asp Arg
435 440 445

Glu Phe Tyr Asn Lys Ala Tyr Asp Leu Leu Ala Arg Ile His Gln Asp
450 455 460

Leu Leu Asp Asn Lys Gly Arg Gln Val Asp Phe Glu Ala Leu Asp Asn
 465 470 475 480
 Leu Leu Glu Arg Leu Lys Asp Val Pro Ser Asp Lys Val Lys Leu Val
 485 490 495
 Asp Asp Ile Leu Ala Phe Leu Ala Pro Ile Arg His Pro Glu Arg Leu
 500 505 510
 Gly Lys Pro Asn Ala Gln Ile Thr Tyr Thr Asp Asp Glu Ile Gln Val
 515 520 525
 Ala Lys Leu Ala Gly Lys Tyr Thr Thr Glu Asp Gly Tyr Ile Phe Asp
 530 535 540
 Pro Arg Asp Ile Thr Ser Asp Glu Gly Asp Ala Tyr Val Thr Pro His
 545 550 555 560
 Met Thr His Ser His Trp Ile Lys Lys Asp Ser Leu Ser Glu Ala Glu
 565 570 575
 Arg Ala Ala Ala Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Lys Gly Leu Thr Pro Pro
 580 585 590
 Ser Thr Asp His Gln Asp Ser Gly Asn Thr Glu Ala Lys Gly Ala Glu
 595 600 605
 Ala Ile Tyr Asn Arg Val Lys Ala Ala Lys Lys Val Pro Leu Asp Arg
 610 615 620
 Met Pro Tyr Asn Leu Gln Tyr Thr Val Glu Val Lys Asn Gly Ser Leu
 625 630 635 640
 Ile Ile Pro His Tyr Asp His Tyr His Asn Ile Lys Phe Glu Trp Phe
 645 650 655
 Asp Glu Gly Leu Tyr Glu Ala Pro Lys Gly Tyr Thr Leu Glu Asp Leu
 660 665 670
 Leu Ala Thr Val Lys Tyr Tyr Val Glu His Pro Asn Glu Arg Pro His
 675 680 685
 Ser Asp Asn Gly Phe Gly Asn Ala Ser Asp His Val Arg Lys Asn Lys
 690 695 700
 Val Asp Gln Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp Lys Glu His Asp Glu Val
 705 710 715 720
 Ser Glu Pro Thr His Pro Glu Ser Asp Glu Lys Glu Asn His Ala Gly
 725 730 735

Leu Asn Pro Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Asp Thr Glu
740 745 750
Glu Thr Glu Glu Glu Ala Glu Asp Thr Thr Asp Glu Ala Glu Ile Pro
755 760 765
Gln Val Glu Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys Ile Ala Asp Ala Glu Ala
770 775 780
Leu Leu Glu Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Glu
785 790 795 800
Thr Leu Thr Gly Leu Lys Ser Ser Leu Leu Leu Gly Thr Lys Asp Asn
805 810 815
Asn Thr Ile Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu Ala Leu Leu Lys Glu
820 825 830
Ser Gln Pro Ala Pro Ile Gln
835

<210>2
<211> 493
<212> PRT
<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 2

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

Phe Glu Ala Leu Asp Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Asp Val Pro Ser
 130 135 140
 Asp Lys Val Lys Leu Val Asp Asp Ile Leu Ala Phe Leu Ala Pro Ile
 145 150 155 160
 Arg His Pro Glu Arg Leu Gly Lys Pro Asn Ala Gln Ile Thr Tyr Thr
 165 170 175
 Asp Asp Glu Ile Gln Val Ala Lys Leu Ala Gly Lys Tyr Thr Thr Glu
 180 185 190
 Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Pro Arg Asp Ile Thr Ser Asp Glu Gly Asp
 195 200 205
 Ala Tyr Val Thr Pro His Met Thr His Ser His Trp Ile Lys Lys Asp
 210 215 220
 Ser Leu Ser Glu Ala Glu Arg Ala Ala Ala Gln Ala Tyr Ala Lys Glu
 225 230 235 240
 Lys Gly Leu Thr Pro Pro Ser Thr Asp His Gln Asp Ser Gly Asn Thr
 245 250 255
 Glu Ala Lys Gly Ala Glu Ala Ile Tyr Asn Arg Val Lys Ala Ala Lys
 260 265 270
 Lys Val Pro Leu Asp Arg Met Pro Tyr Asn Leu Gln Tyr Thr Val Glu
 275 280 285
 Val Lys Asn Gly Ser Leu Ile Ile Pro His Tyr Asp His Tyr His Asn
 290 295 300
 Ile Lys Phe Glu Trp Phe Asp Glu Gly Leu Tyr Glu Ala Pro Lys Gly
 305 310 315 320
 Tyr Thr Leu Glu Asp Leu Leu Ala Thr Val Lys Tyr Tyr Val Glu His
 325 330 335
 Pro Asn Glu Arg Pro His Ser Asp Asn Gly Phe Gly Asn Ala Ser Asp
 340 345 350
 His Val Arg Lys Asn Lys Val Asp Gln Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp
 355 360 365
 Lys Glu His Asp Glu Val Ser Glu Pro Thr His Pro Glu Ser Asp Glu
 370 375 380
 Lys Glu Asn His Ala Gly Leu Asn Pro Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys
 385 390 395 400

Pro Ser Thr Asp Thr Glu Glu Thr Glu Glu Glu Ala Glu Asp Thr Thr
405 410 415
Asp Glu Ala Glu Ile Pro Gln Val Glu Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys
420 425 430
Ile Ala Asp Ala Glu Ala Leu Leu Glu Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile
435 440 445
Arg Gln Asn Ala Met Glu Thr Leu Thr Gly Leu Lys Ser Ser Leu Leu
450 455 460
Leu Gly Thr Lys Asp Asn Asn Thr Ile Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu
465 470 475 480
Leu Ala Leu Leu Lys Glu Ser Gln Pro Ala Pro Ile Gln
485 490

<210>3
<211> 164
<212> PRT
<213> *Streptococcus pneumoniae*
<400> 3

5

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

Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu Ala Leu Leu Lys Glu Ser Gln Pro
145 150 155 160

Ala Pro Ile Gln

<210>4
<211> 141
<212> PRT
<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 4

His Val Arg Lys Asn Lys Val Asp Gln Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp
1 5 10 15

Lys Glu His Asp Glu Val Ser Glu Pro Thr His Pro Glu Ser Asp Glu
20 25 30

Lys Glu Asn His Ala Gly Leu Asn Pro Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys
35 40 45

Pro Ser Thr Asp Thr Glu Glu Thr Glu Glu Glu Ala Glu Asp Thr Thr
50 55 60

Asp Glu Ala Glu Ile Pro Gln Val Glu Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys
65 70 75 80

Ile Ala Asp Ala Glu Ala Leu Leu Glu Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile
85 90 95

Arg Gln Asn Ala Met Glu Thr Leu Thr Gly Leu Lys Ser Ser Leu Leu
100 105 110

Leu Gly Thr Lys Asp Asn Asn Thr Ile Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu
115 120 125

Leu Ala Leu Leu Lys Glu Ser Gln Pro Ala Pro Ile Gln
130 135 140

<210>5
<211> 1482
<212> ADN
<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 5

atgtgggtgc	ccgacagcag	acccgagcag	cccagcccc	agagcacccc	cgagcccagc	60
cccagcccc	agcccgcccc	caacccccag	cccgccccca	gcaaccccat	cgacgagaag	120
ctggtgaagg	aggccgtgag	aaagggtggc	gacggctacg	tgttcgagga	gaacggcgtg	180
agcagataca	tccccgcca	ggacctgagc	gccgagaccg	ccgccggcat	cgacagcaag	240
ctggccaagc	aggagagcct	gagccacaag	ctgggcgcca	agaagaccga	cctgcccagc	300
agcgacagag	agttctacaa	caaggcctac	gacctgctgg	ccagaatcca	ccaggacctg	360
ctggacaaca	agggcagaca	ggtggacttc	gaggccctgg	acaacctgct	ggagagactg	420
aaggacgtgc	ccagcgacaa	ggtgaagctg	gtggacgaca	tcctggcctt	cctggcccc	480
atcagacacc	ccgagagact	gggcaagccc	aacgcccaga	tcacctacac	cgacgacgag	540
atccaggtgg	ccaagctggc	cggcaagtac	accaccgagg	acggctacat	cttcgacccc	600
agagacatca	ccagcgacga	gggcgacgcc	tacgtgaccc	cccacatgac	ccacagccac	660
tggatcaaga	aggacagcct	gagcgaggcc	gagagagccg	ccgccaggc	ctacgccaa	720
gagaagggcc	tgaccccccc	cagcaccgac	caccaggaca	gcggaacac	cgaggccaag	780
ggcgccgagg	ccatctacaa	cagagtgaag	gccgccaaga	aggtgcccct	ggacagaatg	840
ccctacaacc	tgcagtacac	cgtggagggtg	aagaacggca	gcctgatcat	ccccactac	900
gaccactacc	acaacatcaa	gttcgagtgg	ttcgacgagg	gcctgtacga	ggcccccaag	960
ggctacaccc	tggaggacct	gctggccacc	gtgaagtact	acgtggagca	ccccaacgag	1020
agaccccaca	gcgacaacgg	cttcggcaac	gccagcgacc	acgtgagaaa	gaacaagggtg	1080
gaccaggaca	gcaagcccga	cgaggacaag	gagcacgacg	aggtgagcga	gcccaccac	1140
cccgagagcg	acgagaagga	gaaccacgcc	ggcctgaacc	ccagcgccga	caacctgtac	1200
aagcccagca	ccgacaccga	ggagaccgag	gaggaggccg	aggacaccac	cgacgaggcc	1260
gagatcccc	aggtggagaa	cagcgtgatc	aacgccaaga	tcgccgacgc	cgaggccctg	1320
ctggagaagg	tgaccgaccc	cagcatcaga	cagaacgcca	tggagaccct	gaccggcctg	1380
aagagcagcc	tgctgctggg	caccaaggac	aacaacacca	tcagcgccga	ggtggacagc	1440
ctgctggccc	tgctgaagga	gagccagccc	gcccccatcc	ag		1482

<210>6
 <211> 1503
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus pneumoniae*
 <400> 6

atggggccacc	accaccacca	ccactgggtg	cccgcagca	gacccgagca	gcccagcccc	60
cagagcaccc	ccgagcccag	ccccagcccc	cagcccgcgc	ccaaccccc	gcccgcgcgc	120
agcaaccca	tcgacgagaa	gctggtgaag	gaggccgtga	gaaagggtggg	cgacggctac	180
gtgttcgagg	agaacggcgt	gagcagatac	atccccgcca	aggacctgag	cgccgagacc	240
gccgcccggca	tcgacagcaa	gctggccaag	caggagagcc	tgagccacaa	gctgggcgcc	300
aagaagaccg	acctgcccag	cagcgacaga	gagttctaca	acaaggccta	cgacctgctg	360
gccagaatcc	accaggacct	gctggacaac	aagggcagac	aggtggactt	cgaggccctg	420
gacaacctgc	tggagagact	gaaggacgtg	cccagcgaca	aggtgaagct	ggtggacgac	480
atcctggcct	tcctggcccc	catcagacac	cccgcagagac	tgggcaagcc	caacgcccag	540
atcacctaca	ccgacgacga	gatccaggtg	gccaagctgg	ccggcaagta	caccaccgag	600
gacggctaca	tcttcgaccc	cagagacatc	accagcgacg	agggcgacgc	ctacgtgacc	660
ccccacatga	cccacagcca	ctggatcaag	aaggacagcc	tgagcgaggc	cgagagagcc	720
gccgcccagg	cctacgccaa	ggagaagggc	ctgaccccc	ccagcaccga	ccaccaggac	780
agcggcaaca	ccgaggccaa	gggcgcccag	gccatctaca	acagagtga	ggccgccaag	840
aagggtgccc	tggacagaat	gccctacaac	ctgcagtaca	ccgtggaggt	gaagaacggc	900
agcctgatca	tccccacta	cgaccactac	cacaacatca	agttcgagtg	gttcgacgag	960
ggcctgtacg	aggcccccaa	gggctacacc	ctggaggacc	tgctggccac	cgtgaagtac	1020
tacgtggagc	acccaacga	gagacccac	agcgacaacg	gcttcggcaa	cgccagcgac	1080
cacgtgagaa	agaacaaggt	ggaccaggac	agcaagcccc	acgaggacaa	ggagcacgac	1140
gaggtgagcg	agcccaccca	ccccgagagc	gacgagaagg	agaaccacgc	cggcctgaac	1200
cccagcgccg	acaacctgta	caagcccagc	accgacaccg	aggagaccga	ggaggaggcc	1260
gaggacacca	ccgacgaggc	cgagatcccc	cagggtggaga	acagcgtgat	caacgccaa	1320
atcgccgacg	ccgaggccct	gctggagaag	gtgaccgacc	ccagcatcag	acagaacgcc	1380
atggagaccc	tgaccggcct	gaagagcagc	ctgctgctgg	gcaccaagga	caacaacacc	1440
atcagcgccg	aggtggacag	cctgctggcc	ctgctgaagg	agagccagcc	cgccccatc	1500
cag						1503

<210>7
 <211> 495
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus pneumoniae*
 <400> 7

atggtgaagt actacgtgga gcacccaac gagagacccc acagcgacaa cggcttcggc 60
 aacgccagcg accacgtgag aaagaacaag gtggaccagg acagcaagcc cgacgaggac 120
 aaggagcacg acgaggtgag cgagcccacc caccgagaga gcgacgagaa ggagaaccac 180
 gccggcctga accccagcgc cgacaacctg tacaagcca gcaccgacac cgaggagacc 240
 gaggaggagg ccgaggacac caccgacgag gccgagatcc cccaggtgga gaacagcgtg 300
 atcaacgcc aagatcgccga cgccgaggcc ctgctggaga aggtgaccga cccagcatc 360
 agacagaacg ccatggagac cctgaccggc ctgaagagca gcctgctgct gggcaccaag 420
 gacaacaaca ccatcagcgc cgaggtggac agcctgctgg ccctgctgaa ggagagccag 480
 cccgccccca tccag 495

<210>8
 <211> 516
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 8
 atgggccacc accaccacca ccacgtgaag tactacgtgg agcaccacaa cgagagaccc 60
 cacagcgaca acggcttcgg caacgccagc gaccacgtga gaaagaacaa ggtggaccag 120
 gacagcaagc ccgacgagga caaggagcac gacgaggtga gcgagccac ccaccccgag 180
 agcgacgaga aggagaacca cgccggcctg aacccagcgc ccgacaacct gtacaagccc 240
 agcaccgaca ccgaggagac cgaggaggag gccgaggaca ccaccgacga ggccgagatc 300
 cccaggtgg agaacagcgt gatcaacgcc aagatcgccg acgccgaggc cctgctggag 360
 aaggtgaccg accccagcat cagacagaac gccatggaga ccctgaccgg cctgaagagc 420
 agcctgctgc tgggcaccaa ggacaacaac accatcagcg ccgaggtgga cagcctgctg 480
 gccctgctga aggagagcca gcccgcctcc atccag 516

<210>9
 <211> 426
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 9
 atgcacgtga gaaagaacaa ggtggaccag gacagcaagc ccgacgagga caaggagcac 60
 gacgaggtga gcgagccac ccaccccgag agcgacgaga aggagaacca cgccggcctg 120
 aacccagcgc ccgacaacct gtacaagccc agcaccgaca ccgaggagac cgaggaggag 180
 gccgaggaca ccaccgacga ggccgagatc cccaggtgg agaacagcgt gatcaacgcc 240
 aagatcgccg acgccgaggc cctgctggag aaggtgaccg accccagcat cagacagaac 300
 gccatggaga ccctgaccgg cctgaagagc agcctgctgc tgggcaccaa ggacaacaac 360
 accatcagcg ccgaggtgga cagcctgctg gccctgctga aggagagcca gcccgcctcc 420
 atccag 426

5	<210> 10		
	<211> 447		
	<212> ADN		
	<213> <i>Streptococcus pneumoniae</i>		
	<400> 10		
	atggggccacc accaccacca ccaccacgtg agaaagaaca aggtggacca ggacagcaag	60	
	cccgacgagg acaaggagca cgacgaggtg agcgagccca cccaccccga gagcgacgag	120	
	aaggagaacc acgccggcct gaaccccagc gccgacaacc tgtacaagcc cagcaccgac	180	
	accgaggaga ccgaggagga ggccgaggac accaccgacg aggccgagat cccccaggtg	240	
	gagaacagcg tgatcaacgc caagatcgcc gacgccgagg ccctgctgga gaaggtgacc	300	
	gaccccagca tcagacagaa cgccatggag accctgaccg gcctgaagag cagcctgctg	360	
	ctgggcacca aggacaacaa caccatcagc gccgaggtgg acagcctgct ggccctgctg	420	
	aaggagagcc agcccccccc catccag	447	
10	<210> 11		
	<211> 52		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<400> 11		
	ctagccatgg gacatcatca tcatcatcac tgggtaccag attcaagacc ag	52	
20	<210> 12		
	<211> 53		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<400> 12		
	ctagccatgg gacatcatca tcatcatcac gtcaagtact atgtcgaaca tcc	53	
30	<210> 13		
	<211> 54		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<400> 13		
35	ctagccatgg gacatcatca tcatcatcac catgttcgta aaaataaggt agac	54	
40	<210> 14		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<400> 14		
45	tgccctcgag ttactactgt ataggagccg gtt	33	
50	<210> 15		
	<211> 501		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<400> 15		

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

Glu Arg Leu Lys Asp Val Pro Ser Asp Lys Val Lys Leu Val Asp Asp
 145 150 155 160
 Ile Leu Ala Phe Leu Ala Pro Ile Arg His Pro Glu Arg Leu Gly Lys
 165 170 175
 Pro Asn Ala Gln Ile Thr Tyr Thr Asp Asp Glu Ile Gln Val Ala Lys
 180 185 190
 Leu Ala Gly Lys Tyr Thr Thr Glu Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Pro Arg
 195 200 205
 Asp Ile Thr Ser Asp Glu Gly Asp Ala Tyr Val Thr Pro His Met Thr
 210 215 220
 His Ser His Trp Ile Lys Lys Asp Ser Leu Ser Glu Ala Glu Arg Ala
 225 230 235 240
 Ala Ala Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Lys Gly Leu Thr Pro Pro Ser Thr
 245 250 255
 Asp His Gln Asp Ser Gly Asn Thr Glu Ala Lys Gly Ala Glu Ala Ile
 260 265 270
 Tyr Asn Arg Val Lys Ala Ala Lys Lys Val Pro Leu Asp Arg Met Pro
 275 280 285
 Tyr Asn Leu Gln Tyr Thr Val Glu Val Lys Asn Gly Ser Leu Ile Ile
 290 295 300
 Pro His Tyr Asp His Tyr His Asn Ile Lys Phe Glu Trp Phe Asp Glu
 305 310 315 320
 Gly Leu Tyr Glu Ala Pro Lys Gly Tyr Thr Leu Glu Asp Leu Leu Ala
 325 330 335
 Thr Val Lys Tyr Tyr Val Glu His Pro Asn Glu Arg Pro His Ser Asp
 340 345 350
 Asn Gly Phe Gly Asn Ala Ser Asp His Val Arg Lys Asn Lys Val Asp
 355 360 365
 Gln Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp Lys Glu His Asp Glu Val Ser Glu
 370 375 380
 Pro Thr His Pro Glu Ser Asp Glu Lys Glu Asn His Ala Gly Leu Asn
 385 390 395 400
 Pro Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Asp Thr Glu Glu Thr
 405 410 415

Glu Glu Glu Ala Glu Asp Thr Thr Asp Glu Ala Glu Ile Pro Gln Val
420 425 430
Glu Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys Ile Ala Asp Ala Glu Ala Leu Leu
435 440 445
Glu Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Glu Thr Leu
450 455 460
Thr Gly Leu Lys Ser Ser Leu Leu Leu Gly Thr Lys Asp Asn Asn Thr
465 470 475 480
Ile Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu Ala Leu Leu Lys Glu Ser Gln
485 490 495
Pro Ala Pro Ile Gln
500

<210> 16
<211> 172
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<400> 16

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

Gly Thr Lys Asp Asn Asn Thr Ile Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu
145 150 155 160

Ala Leu Leu Lys Glu Ser Gln Pro Ala Pro Ile Gln
165 170

5
<210> 17
<211> 149
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<400> 17

Met Gly His His His His His His Val Arg Lys Asn Lys Val Asp
1 5 10 15

Gln Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp Lys Glu His Asp Glu Val Ser Glu
20 25 30

Pro Thr His Pro Glu Ser Asp Glu Lys Glu Asn His Ala Gly Leu Asn
35 40 45

Pro Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Asp Thr Glu Glu Thr
50 55 60

Glu Glu Glu Ala Glu Asp Thr Thr Asp Glu Ala Glu Ile Pro Gln Val
65 70 75 80

Glu Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys Ile Ala Asp Ala Glu Ala Leu Leu
85 90 95

Glu Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile Arg Gln Asn Ala Met Glu Thr Leu
100 105 110

Thr Gly Leu Lys Ser Ser Leu Leu Leu Gly Thr Lys Asp Asn Asn Thr
115 120 125

Ile Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu Ala Leu Leu Lys Glu Ser Gln
130 135 140

Pro Ala Pro Ile Gln
145

10
<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15
<400> 18

Met Gly His His His His His His
1 5

20
<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<400> 19
 Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

5 <210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <400> 20
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

15 <210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<400> 21
 Ser Arg Arg His His Cys Arg Ser Lys Ala Lys Arg Ser Arg His His
 1 5 10 15

20 <210> 22
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <400> 22
 Gly Arg Arg His His Arg Arg Ser Lys Ala Lys Arg Ser Arg
 1 5 10

30 <210> 23
 <211> 2565
 <212> ADN
 <213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 23
 ttactactgt ataggagccg gttgactttc ttttaacaaa gccaaagagac tatctacttc 60
 tgctgaaata gtgttattat ctttcgttcc gagaagaaga ctacttttta gaccagtcaa 120
 tgtctccata gcattttgtc taatactagg atctgttact ttttctagca aggcctccgc 180
 atctgctatc ttagcgtaa taacagaatt ctctacttga ggaatttcag cctcatctgt 240
 ggtatcttca gcttcttcct ctgtctcttc cgtatcagtg cttggtttat aaagattatc 300
 tgctgaagga tttaaaccag cgtgattctc tttttcatca gattcagggg gagttggctc 360
 acttacttca tcatgttcct tatcttcac caggtttactg tcttgggtcta ccttattttt 420
 acgaacatgg tcgctagcgt taccaaaacc attatctgaa tgcggacgtt cgtttgatg 480
 ttcgacatag tacttgacag tcgccaaaag atcctcaaga gtataccct taggtgcctc 540
 ataaaggcct tcgtcaaacc actcaaattt gatgttatgg taatgggtcat aatgaggtat 600

35

gattaaacta ccgtttttga cttctacagt atattgaaga ttgtaaggca tacgatcaag 660
 tggcaccttc ttagctgctt tcacgcggtt gtagatagct tctgctcctt ttgcctcagt 720
 atttcctgaa tcctgatggt ctgtcgaagg aggggtcaaa cttttctctt tagcataagc 780
 ctgggctgcc gctctctcag cttcagacaa actatctttt ttaatccagt ggctatgggt 840
 catatgtgga gttacatagg catccccctc atcactgggt atatcacgag gatcaaagat 900
 ataaccgtct tctgttggtt acttgccctgc caacttgggt acttgaatct catcatcagt 960
 gtaggtaatt tgcgcatttg gttttcctaa acgttctgga tgacgaatcg gagctaagaa 1020
 ggcaagaata tcatccacta acttgacttt atcacttggg acatccttga gtcgttcctaa 1080
 caggttatcc aaagcctcaa aatcaacttg tcgaccttta ttatcaagta aatcttgggtg 1140
 aattcttgct agtaagtcac aagccttatt gtaaaattct cgatcactag atgggaggtc 1200
 agttttctta gctcctagct tatgagataa actttcctgc ttggccagtt tgctatcaat 1260
 gcctgctgct gtttctgctg aaagatcctt ggctgggata taacgagaaa ctccattctc 1320
 ctcaaagaca taaccatcgc ctacttttcg aacagcttct ttgaccaatt tctcatcaat 1380
 tggattgctt ggagctgggt gaggatttgg tgcaggttgc ggacttggac taggttccgg 1440
 agtcgattgt ggacttgggt gttctgggtt tgaatctggt acccaatggt ttgaacgata 1500
 acgaagggga ataatacgag caattcgttt ttccaattca gacatttgtt cataagggat 1560
 aaagtggtaa tggttaccat gagggacagc tacacctctg gcggttcgac ttgtgatttg 1620
 cgctgggtcg aaaataaggc catcagattc cacatggcgt tctgataagg gtttagcata 1680
 caattcacgt aaaaggcttg aaatgttttc cccttgattt tgatgataag ttggagtgc 1740
 agtcagattg tggttctctg acaatcttgg ttgagctgga tttgcattat aactagaact 1800
 tgaagaagga cgagatccct gcttcccatt ccaataggct tctgcagcag ctaactcgct 1860
 agctgataac tcattcttag gaatgtaatg gtaatggctg ccgtgaggaa cgatataagc 1920
 atcacccgtg tcctcaatga tatcagatgc attgaagata taaccatcat ccgttgatata 1980
 gcgtccttgg gctctggctg caactactgc ttgatcgta gaaccacccc cgtgattatg 2040
 actgtgttcc tgcttctgac gtttaatctc ttcttttgc cgaatattat ccgcatgagc 2100
 tgcacctta aggtaaacat agtattttcc atctacctg ataacataac cacccttgat 2160
 ttcatgaca atgtctgaat ctttcaactg ataattcgga tctttcatga ggagctcttc 2220
 actgatgatg gcatcataag ggaccttgcc attatagtaa tgataatggt ctccatgaga 2280
 ggtcacataa ccttgatccg taatcttgat gacgatttgt tcggcgttga tccccctcct 2340
 ctactgact tcatctgggt tcaagttttc tgccttttga ccagcctgat caccatctat 2400
 ataagaaact cgattagact ctttcttaac ctgaccagct tggtgacgac caagttcata 2460
 ggaagatccg cgaccattt gctgtccacc agtcatgcta gccatatggc tgccgcgcgg 2520
 caccaggccg ctgctgtgat gatgatgatg atggctgctg cccat 2565

<210> 24
 <211> 853
 <212> PRT

<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 24

```

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
 1          5          10          15

Arg Gly Ser His Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg
 20        25          30

Gly Ser Ser Tyr Glu Leu Gly Arg His Gln Ala Gly Gln Val Lys Lys
 35        40          45

Glu Ser Asn Arg Val Ser Tyr Ile Asp Gly Asp Gln Ala Gly Gln Lys
 50        55          60

Ala Glu Asn Leu Thr Pro Asp Glu Val Ser Lys Arg Glu Gly Ile Asn
 65        70          75          80

Ala Glu Gln Ile Val Ile Lys Ile Thr Asp Gln Gly Tyr Val Thr Ser
 85        90          95

His Gly Asp His Tyr His Tyr Tyr Asn Gly Lys Val Pro Tyr Asp Ala
100        105        110

Ile Ile Ser Glu Glu Leu Leu Met Lys Asp Pro Asn Tyr Gln Leu Lys
115        120        125

Asp Ser Asp Ile Val Asn Glu Ile Lys Gly Gly Tyr Val Ile Lys Val
130        135        140

Asp Gly Lys Tyr Tyr Val Tyr Leu Lys Asp Ala Ala His Ala Asp Asn
145        150        155        160

Ile Arg Thr Lys Glu Glu Ile Lys Arg Gln Lys Gln Glu His Ser His
165        170        175

Asn His Gly Gly Gly Ser Asn Asp Gln Ala Val Val Ala Ala Arg Ala
180        185        190

Gln Gly Arg Tyr Thr Thr Asp Asp Gly Tyr Ile Phe Asn Ala Ser Asp
195        200        205

Ile Ile Glu Asp Thr Gly Asp Ala Tyr Ile Val Pro His Gly Asp His
210        215        220

Tyr His Tyr Ile Pro Lys Asn Glu Leu Ser Ala Ser Glu Leu Ala Ala
225        230        235        240

Ala Glu Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Gln Gly Ser Arg Pro Ser Ser Ser

```

				245					250					255			
Ser	Ser	Tyr	Asn 260	Ala	Asn	Pro	Ala	Gln 265	Pro	Arg	Leu	Ser	Glu 270	Asn	His		
Asn	Leu	Thr 275	Val	Thr	Pro	Thr	Tyr 280	His	Gln	Asn	Gln	Gly 285	Glu	Asn	Ile		
Ser	Ser 290	Leu	Leu	Arg	Glu	Leu 295	Tyr	Ala	Lys	Pro	Leu 300	Ser	Glu	Arg	His		
Val 305	Glu	Ser	Asp	Gly	Leu 310	Ile	Phe	Asp	Pro	Ala 315	Gln	Ile	Thr	Ser	Arg		
Thr	Ala	Arg	Gly	Val 325	Ala	Val	Pro	His	Gly 330	Asn	His	Tyr	His	Phe 335	Ile		
Pro	Tyr	Glu	Gln 340	Met	Ser	Glu	Leu	Glu 345	Lys	Arg	Ile	Ala	Arg 350	Ile	Ile		
Pro	Leu	Arg 355	Tyr	Arg	Ser	Asn	His 360	Trp	Val	Pro	Asp	Ser 365	Arg	Pro	Glu		
Gln	Pro 370	Ser	Pro	Gln	Ser	Thr 375	Pro	Glu	Pro	Ser	Pro 380	Ser	Pro	Gln	Pro		
Ala 385	Pro	Asn	Pro	Gln	Pro 390	Ala	Pro	Ser	Asn	Pro 395	Ile	Asp	Glu	Lys	Leu 400		
Val	Lys	Glu	Ala	Val 405	Arg	Lys	Val	Gly	Asp 410	Gly	Tyr	Val	Phe	Glu 415	Glu		
Asn	Gly	Val	Ser 420	Arg	Tyr	Ile	Pro	Ala 425	Lys	Asp	Leu	Ser	Ala 430	Glu	Thr		
Ala	Ala	Gly 435	Ile	Asp	Ser	Lys	Leu 440	Ala	Lys	Gln	Glu	Ser 445	Leu	Ser	His		
Lys	Leu 450	Gly	Ala	Lys	Lys	Thr 455	Asp	Leu	Pro	Ser	Ser 460	Asp	Arg	Glu	Phe		
Tyr 465	Asn	Lys	Ala	Tyr	Asp 470	Leu	Leu	Ala	Arg	Ile 475	His	Gln	Asp	Leu	Leu 480		
Asp	Asn	Lys	Gly	Arg 485	Gln	Val	Asp	Phe	Glu 490	Ala	Leu	Asp	Asn	Leu 495	Leu		
Glu	Arg	Leu	Lys 500	Asp	Val	Pro	Ser	Asp 505	Lys	Val	Lys	Leu	Val 510	Asp	Asp		
Ile	Leu	Ala	Phe	Leu	Ala	Pro	Ile	Arg	His	Pro	Glu	Arg	Leu	Gly	Lys		

515	520	525
Pro Asn Ala Gln Ile Thr Tyr Thr Asp Asp Glu Ile Gln Val Ala Lys		
530	535	540
Leu Ala Gly Lys Tyr Thr Thr Glu Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Pro Arg		
545	550	555
Asp Ile Thr Ser Asp Glu Gly Asp Ala Tyr Val Thr Pro His Met Thr		
565	570	575
His Ser His Trp Ile Lys Lys Asp Ser Leu Ser Glu Ala Glu Arg Ala		
580	585	590
Ala Ala Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Lys Gly Leu Thr Pro Pro Ser Thr		
595	600	605
Asp His Gln Asp Ser Gly Asn Thr Glu Ala Lys Gly Ala Glu Ala Ile		
610	615	620
Tyr Asn Arg Val Lys Ala Ala Lys Lys Val Pro Leu Asp Arg Met Pro		
625	630	635
Tyr Asn Leu Gln Tyr Thr Val Glu Val Lys Asn Gly Ser Leu Ile Ile		
645	650	655
Pro His Tyr Asp His Tyr His Asn Ile Lys Phe Glu Trp Phe Asp Glu		
660	665	670
Gly Leu Tyr Glu Ala Pro Lys Gly Tyr Thr Leu Glu Asp Leu Leu Ala		
675	680	685
Thr Val Lys Tyr Tyr Val Glu His Pro Asn Glu Arg Pro His Ser Asp		
690	695	700
Asn Gly Phe Gly Asn Ala Ser Asp His Val Arg Lys Asn Lys Val Asp		
705	710	715
Gln Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp Lys Glu His Asp Glu Val Ser Glu		
725	730	735
Pro Thr His Pro Glu Ser Asp Glu Lys Glu Asn His Ala Gly Leu Asn		
740	745	750
Pro Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys Pro Ser Thr Asp Thr Glu Glu Thr		
755	760	765
Glu Glu Glu Ala Glu Asp Thr Thr Asp Glu Ala Glu Ile Pro Gln Val		
770	775	780
Glu Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys Ile Ala Asp Ala Glu Ala Leu Leu		

[illegible]

<210> 25
<211> 843
<212> PRT
<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 25

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

Val Val Ala Ala Arg Ala Gln Gly Arg Tyr Thr Thr Asp Asp Gly Tyr
 180 185 190
 Ile Phe Asn Ala Ser Asp Ile Ile Glu Asp Thr Gly Asp Ala Tyr Ile
 195 200 205
 Val Pro His Gly Asp His Tyr His Tyr Ile Pro Lys Asn Glu Leu Ser
 210 215 220
 Ala Ser Glu Leu Ala Ala Ala Glu Ala Tyr Trp Asn Gly Lys Gln Gly
 225 230 235 240
 Ser Arg Pro Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Asn Ala Asn Pro Ala Gln Pro
 245 250 255
 Arg Leu Ser Glu Asn His Asn Leu Thr Val Thr Pro Thr Tyr His Gln
 260 265 270
 Asn Gln Gly Glu Asn Ile Ser Ser Leu Leu Arg Glu Leu Tyr Ala Lys
 275 280 285
 Pro Leu Ser Glu Arg His Val Glu Ser Asp Gly Leu Ile Phe Asp Pro
 290 295 300
 Ala Gln Ile Thr Ser Arg Thr Ala Arg Gly Val Ala Val Pro His Gly
 305 310 315 320
 Asn His Tyr His Phe Ile Pro Tyr Glu Gln Met Ser Glu Leu Glu Lys
 325 330 335
 Arg Ile Ala Arg Ile Ile Pro Leu Arg Tyr Arg Ser Asn His Trp Val
 340 345 350
 Pro Asp Ser Arg Pro Glu Gln Pro Ser Pro Gln Ser Thr Pro Glu Pro
 355 360 365
 Ser Pro Ser Pro Gln Pro Ala Pro Asn Pro Gln Pro Ala Pro Ser Asn
 370 375 380
 Pro Ile Asp Glu Lys Leu Val Lys Glu Ala Val Arg Lys Val Gly Asp
 385 390 395 400
 Gly Tyr Val Phe Glu Glu Asn Gly Val Ser Arg Tyr Ile Pro Ala Lys
 405 410 415
 Asp Leu Ser Ala Glu Thr Ala Ala Gly Ile Asp Ser Lys Leu Ala Lys
 420 425 430
 Gln Glu Ser Leu Ser His Lys Leu Gly Ala Lys Lys Thr Asp Leu Pro
 435 440 445

Ser Ser Asp Arg Glu Phe Tyr Asn Lys Ala Tyr Asp Leu Leu Ala Arg
 450 455 460
 Ile His Gln Asp Leu Leu Asp Asn Lys Gly Arg Gln Val Asp Phe Glu
 465 470 475 480
 Ala Leu Asp Asn Leu Leu Glu Arg Leu Lys Asp Val Pro Ser Asp Lys
 485 490 495
 Val Lys Leu Val Asp Asp Ile Leu Ala Phe Leu Ala Pro Ile Arg His
 500 505 510
 Pro Glu Arg Leu Gly Lys Pro Asn Ala Gln Ile Thr Tyr Thr Asp Asp
 515 520 525
 Glu Ile Gln Val Ala Lys Leu Ala Gly Lys Tyr Thr Thr Glu Asp Gly
 530 535 540
 Tyr Ile Phe Asp Pro Arg Asp Ile Thr Ser Asp Glu Gly Asp Ala Tyr
 545 550 555 560
 Val Thr Pro His Met Thr His Ser His Trp Ile Lys Lys Asp Ser Leu
 565 570 575
 Ser Glu Ala Glu Arg Ala Ala Ala Gln Ala Tyr Ala Lys Glu Lys Gly
 580 585 590
 Leu Thr Pro Pro Ser Thr Asp His Gln Asp Ser Gly Asn Thr Glu Ala
 595 600 605
 Lys Gly Ala Glu Ala Ile Tyr Asn Arg Val Lys Ala Ala Lys Lys Val
 610 615 620
 Pro Leu Asp Arg Met Pro Tyr Asn Leu Gln Tyr Thr Val Glu Val Lys
 625 630 635 640
 Asn Gly Ser Leu Ile Ile Pro His Tyr Asp His Tyr His Asn Ile Lys
 645 650 655
 Phe Glu Trp Phe Asp Glu Gly Leu Tyr Glu Ala Pro Lys Gly Tyr Thr
 660 665 670
 Leu Glu Asp Leu Leu Ala Thr Val Lys Tyr Tyr Val Glu His Pro Asn
 675 680 685
 Glu Arg Pro His Ser Asp Asn Gly Phe Gly Asn Ala Ser Asp His Val
 690 695 700
 Arg Lys Asn Lys Val Asp Gln Asp Ser Lys Pro Asp Glu Asp Lys Glu
 705 710 715 720

His Asp Glu Val Ser Glu Pro Thr His Pro Glu Ser Asp Glu Lys Glu
725 730 735
Asn His Ala Gly Leu Asn Pro Ser Ala Asp Asn Leu Tyr Lys Pro Ser
740 745 750
Thr Asp Thr Glu Glu Thr Glu Glu Glu Ala Glu Asp Thr Thr Asp Glu
755 760 765
Ala Glu Ile Pro Gln Val Glu Asn Ser Val Ile Asn Ala Lys Ile Ala
770 775 780
Asp Ala Glu Ala Leu Leu Glu Lys Val Thr Asp Pro Ser Ile Arg Gln
785 790 795 800
Asn Ala Met Glu Thr Leu Thr Gly Leu Lys Ser Ser Leu Leu Leu Gly
805 810 815
Thr Lys Asp Asn Asn Thr Ile Ser Ala Glu Val Asp Ser Leu Leu Ala
820 825 830
Leu Leu Lys Glu Ser Gln Pro Ala Pro Ile Gln
835 840

<210> 26
<211> 101
<212> PRT
<213> *Streptococcus pneumoniae*

<400> 26

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

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico aislado seleccionado de entre el grupo que consiste en:

(a) un ácido nucleico que codifica un polipéptido de *S. pneumoniae* que presenta una secuencia que consiste en SEC ID nº 4;

(b) un ácido nucleico que codifica un polipéptido de *S. pneumoniae* que presenta al menos 90% de identidad con SEC ID nº 26;

(c) un ácido nucleico totalmente complementario a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de *S. pneumoniae* de (a) o (b); y

(d) un ARN de (a) o (b), en el que U está sustituido por T.

2. Vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 1, enlazado operablemente a un elemento regulador de la transcripción.

3. Célula que comprende el vector de expresión recombinante según la reivindicación 2.

4. Ácido nucleico aislado según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de *S. pneumoniae* provoca una respuesta inmunitaria.

5. Polipéptido aislado que presenta:

(i) una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 4; o

(ii) al menos 90% de identidad con SEC ID nº 26.

6. Anticuerpo monoclonal que se une específicamente a:

(i) un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 4;

(ii) un determinante antigénico dispuesto en un péptido que presenta una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID nº 4;

(iii) un polipéptido que presenta al menos 90% de identidad con SEC ID nº 24, opcionalmente en el que el anticuerpo monoclonal se une específicamente a un péptido que consiste en SEC ID nº 26; o

(iv) un péptido que presenta al menos 90% de identidad con SEC ID nº 26.

7. Composición inmunógena que comprende un polipéptido al menos 90% idéntico a SEC ID nº 26, opcionalmente en la que el polipéptido consiste en SEC ID nº 26.

8. Polipéptido inmunógeno seleccionado de entre el grupo que consiste en SEC ID nº 4 y SEC ID nº 26.

9. Composición que comprende al menos un polipéptido inmunógeno según la reivindicación 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, que comprende opcionalmente además un adyuvante o al menos otra proteína estreptocócica inmunógena o su fragmento.

10. Composición según la reivindicación 9, en la que la composición resulta adecuada para su administración sobre una superficie mucosa.

11. Composición según la reivindicación 10, en la que la composición es una pulverización nasal, una disolución para nebulizador o un producto de inhalación en aerosol.

12. Polipéptido o composición inmunógeno/a según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para su utilización en la generación de anticuerpos específicos para PhtD en un sujeto.

13. Polipéptido o composición inmunógeno/a según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para su utilización en la reducción del transporte nasal de neumococos en un sujeto.

14. Polipéptido o composición inmunógeno/a según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, para su utilización en la reducción del riesgo de infección neumocócica en un sujeto, opcionalmente en el que:

(i) la infección neumocócica es meningitis, otitis media, neumonía, o uremia hemolítica; o

(ii) el transporte nasal de neumococos no está eliminado.

5 15. Al menos un polipéptido de PhtD o una variante del mismo, seleccionado de entre el grupo como se define en la reivindicación 8, para su utilización en la inmunización de un hospedante contra una infección por una bacteria *Streptococcus* sp., opcionalmente en el que se usa más de un fragmento.

10 16. Composición como se define en la reivindicación 9, para su utilización en el tratamiento de una infección en un hospedante por una bacteria *Streptococcus* sp., opcionalmente en la que la composición comprende más de un polipéptido.

15 17. Composición que comprende un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido que presenta al menos 90% de identidad con SEC ID nº 26, para su utilización en la inhibición de una infección por la especie *Streptococcus* en un hospedante.

20 18. Composición que presenta un primer anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un determinante antigénico de SEC ID nº 26, y al menos un segundo anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un determinante antigénico de SEC ID nº 4, que no se encuentra en SEC ID nº 26, en la que la composición proporciona un efecto sinérgico cuando se administra al sujeto.

19. Polipéptido, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, anticuerpo monoclonal o composición según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 4 a 11, para su utilización como producto farmacéutico.

25 20. Polipéptido, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, anticuerpo monoclonal o composición según la reivindicación 19, para su utilización en la provocación de una respuesta inmunitaria frente a *S. pneumoniae*.