

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 978**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

A61K 39/09 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2005 E 05742528 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2013 EP 1743027**

54 Título: **Proteínas mutantes de neumolisina**

30 Prioridad:

07.05.2004 GB 0410220
07.05.2004 US 569415 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2013

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF GLASGOW (100.0%)**
University Avenue
Glasgow G12 8QQ, GB

72 Inventor/es:

KIRKHAM, LEA-ANN y
MITCHELL, TIMOTHY JOHN

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 427 978 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

Proteínas mutantes de neumolisina.

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas que comprenden proteínas neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* mutantes. La invención además se refiere a dichas proteínas y a los ácidos nucleicos que codifican estas proteínas.

10

Antecedentes de la invención

[0002] *Streptococcus pneumoniae* es un patógeno importante, que produce enfermedades invasivas como neumonía, meningitis y bacteriemia. Incluso en regiones donde se dispone libremente de terapia antibiótica eficaz, la tasa de mortalidad debido a neumonía neumocócica puede ser de hasta el 19% en los pacientes hospitalizados. En países en vías de desarrollo, más de 3 millones de niños menores de 5 años mueren cada año de neumonía, de la cual *S. pneumoniae* es el agente causante más común. *S. pneumoniae* también produce infecciones menos graves pero de mayor prevalencia como otitis media y sinusitis, que tienen un impacto significativo sobre los costes de la atención sanitaria en los países desarrollados. La otitis media es especialmente importante en niños pequeños, mientras que la sinusitis afecta tanto a niños como a adultos.

[0003] La vacuna polisacárida conjugada heptavalente de Wyeth, comercializada como Prevnar® en Estados Unidos y como Prevenar® en el resto del mundo es, en la actualidad, la única vacuna conjugada eficaz disponible para la protección frente a la infección por *Streptococcus pneumoniae* (Kyaw y col., 2002; Hausdorff y col., 2000). La vacuna contienen siete polisacáridos capsulares de *Streptococcus* purificados (serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F) de entre los 90 posibles (Kalin, 1998), conjugado cada uno a una proteína vehículo. La preparación de esta vacuna se describe en la patente de EE. UU. 4.673.574 (Anderson). La proteína utilizada para la conjugación de los polisacáridos capsulares es un toxoide de difteria, el CRM₁₉₇ que ofrece un aumento de la inmunogenicidad de las vacunas en los bebés (Blum y col., 2000; Katkocin, 2000). Sin embargo, cada serotipo de *S. pneumoniae* tiene un polisacárido capsular estructuralmente diferente, de manera que la inmunización con un serotipo tiende a no conferir protección frente a la mayoría de los demás serotipos, aunque se produce cierta protección cruzada frente a los serotipos relacionados con la vacuna (Whitney y col., 2003).

[0004] Se están estudiando técnicas complementarias a la inmunización específica de serotipo. Una posibilidad es utilizar también un factor de virulencia común a las especies como la neumolisina (PLY), la toxina de 53 kDa producida por todas las cepas invasivas de *S. pneumoniae* (Paton y col., 1993). PLY podría usarse sola o como proteína portadora conjugada a los polisacáridos en Prevnar®, ofreciendo un aumento de la eficacia. Alexander y col (1994) mostraron que la inmunización de ratones con un toxoide de PLY confería protección inmunitaria tras la estimulación con 9 serotipos diferentes de *S. pneumoniae*. Se ha demostrado que PLY estimula una respuesta inmunitaria similar a la de la infección por *S. pneumoniae* activando la ruta clásica del complemento (Paton y col., 1984) e induciendo apoptosis de neutrófilos y macrófagos (Cockeran y col., 2002; Kadioglu y col., 2000).

[0005] PLY pertenece al grupo de citolisinas dependientes de colesterol (CDC) que se unen al colesterol de las membranas de la célula huésped antes de la formación de estructuras anulares de 30-50 mer grandes que crean poros líticos (Palmer, 2001; Jedrzejewski, 2001). El mecanismo de formación de poros no está completamente elucidado y existe un gran debate sobre la secuencia de acontecimientos (Bonev y col., 2000; Shepard y col., 1998). Sin embargo, la capacidad para formar poros significa que la PLY nativa es altamente tóxica, lo cual es un problema en términos del desarrollo de composiciones inmunogénicas.

[0006] Aunque el proceso de conjugación utilizado en la producción podría dar lugar a una PLY no tóxica, podría ser más favorable empezar con una forma no tóxica. Adicionalmente, podría ser difícil utilizar una forma tóxica en la preparación de composiciones inmunogénicas no conjugadas. La toxicidad de PLY puede reducirse significativamente mediante una mutagénesis dirigida a sitio para crear toxoides de PLY, conocidos como neumolisoides (Paton, 1996).

55

[0007] Existen diversos toxoides que se ha demostrado proporcionan protección inmunitaria, de forma independiente o conjugados con polisacáridos, a ratones en respuesta a una estimulación con *S. pneumoniae* D39 de tipo 2 virulento (Paton y col., 1991; Alexander y col., 1994). La mayoría de las mutaciones se habían creado previamente en la región de 11 aminoácidos altamente conservada próxima al extremo C-terminal (Mitchell y col.; Berry y col., 1995). Se ha demostrado que este sitio está implicado en la unión a la célula huésped (de los Toyos y col., 1996). Algunas de estas formas mutadas de PLY se describen en la solicitud de patente internacional WO 90/06951; cada una de las mutaciones descritas en esta publicación está dirigido hacia el extremo C-terminal de la proteína.

[0008] Un problema adicional con la PLY es que se agrega tras su producción a gran escala, problema que

65

debe resolverse para poder utilizar PLY en composiciones inmunogénicas. Se considera que la agregación de PLY está relacionada con su oligomerización implicada en la formación de poros. La presente invención intenta reducir o eliminar la interacción PLY-PLY (oligomerización), de modo que disminuirá la posibilidad de agregación durante la producción a gran escala, creando de este modo una forma de PLY que se purifica fácilmente.

5

[0009] Toyos y col. (1996) describen la aparición de anticuerpos monoclonales (AcM) frente a diversas regiones de PLY y su uso en el sondeo de la toxina completa y de una forma «proteínasa K mellada». La proteínasa K corta PLY en fragmentos de 37 kDa y 15 kDa. El anticuerpo AcM PLY 4 solo reconoce PLY completa y ninguno de los fragmentos, lo que indica que el epítipo sobre PLY para este AcM está dentro de la región mellada. Cuando PLY se incubaba previamente con el AcM PLY4 y se añadía después a los liposomas, la toxina dejaba de formar poros en la membrana del liposoma. Esto supone que el sitio bloqueado por el AcM PLY 4 (que se piensa es la región de la asparragina N₁₄₃) es el sitio responsable de la interacción con otros monómeros de PLY para formar poros oligoméricos. La oligomerización de la estreptolisina O a partir de *Streptococcus sp.* también puede bloquearse mediante AcM como demostraron Hugo y col en 1986. Se desconoce si los anticuerpos previenen directamente la oligomerización uniéndose a los sitios de oligomerización o si existe una asociación que entorpezca estéricamente la interacción de los monómeros de la toxina.

[0010] El anticuerpo monoclonal PLY 4 ha sido caracterizado adicionalmente por Suárez-Álvarez y col. (2003) y estos autores sugieren que el epítipo para el AcM PLY 4 está más hacia el extremo 3' que la región N₁₄₃ inicialmente propuesta por Toyos y col. en 1996. Ahora el sitio de reconocimiento parece ser dependiente de conformación y está entre los aminoácidos E₁₅₁-Y₂₄₇ y no dentro de la región N₁₄₃.

[0011] Previamente los presentes inventores crearon una deleción N₁₄₂N₁₄₃ y una sustitución N₁₄₃D dentro de la PLY como pasos iniciales para entender esta región y su papel en la oligomerización. La caracterización de ambos mutantes mostró un comportamiento idéntico al de la PLY nativa en términos de hemólisis y formación de poros (Search, 2002), lo que sugiere que la oligomerización no estaba bloqueada y la toxicidad de los mutantes permanecía sin cambios. Por tanto, las formas mutantes de PLY creadas previamente no mostraban reducción de la toxicidad o de la oligomerización, lo que sugiere que estas mutaciones no ayudarán a la producción de composiciones inmunogénicas.

30

Resumen de la invención

[0012] La presente invención se refiere en líneas generales a composiciones inmunogénicas que comprenden proteínas neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* mutantes. La invención además se refiere a dichas proteínas y a los ácidos nucleicos que codifican estas proteínas.

35

[0013] La invención proporciona una proteína neumolisina (PLY) mutante aislada, donde la proteína PLY mutante tiene al menos el 80% de identidad de secuencia con la proteína PLY nativa que tiene la secuencia mostrada en la figura 1 y difiere de dicha proteína PLY nativa en la presencia de una deleción de uno o más aminoácidos en la región de aminoácidos 144 a 151 de la secuencia nativa, de modo que la toxicidad del mutante se reduce en relación con la proteína nativa.

40

[0014] Por ejemplo, la proteína PLY mutante puede diferir de la proteína nativa en la deleción de dos aminoácidos adyacentes dentro de la región de aminoácidos 144 a 151 de la secuencia nativa como, por ejemplo, por la deleción de los aminoácidos valina 144 y prolina 145, alanina 146 y arginina 147, metionina 148 y glutamina 149 o tirosina 150 y ácido glutámico 151.

45

[0015] Cualquiera de las proteínas PLY mutantes mencionadas anteriormente puede además comprender al menos una sustitución o deleción de aminoácidos en al menos una de las regiones de aminoácidos 257-297, 367-397 o 424-437 de la secuencia nativa.

50

[0016] La proteína PLY mutante aislada presentaba una toxicidad reducida en mamíferos. Esto es típicamente una consecuencia de tener la actividad de formación de poros reducida, lo que puede asociarse con una reducción de la actividad hemolítica y/o reducción de la actividad de oligomerización, en comparación con la proteína PLY nativa. De forma deseable, aunque no necesariamente, la proteína PLY mutante presenta una reducción de la actividad de oligomerización para facilitar su purificación y posterior manipulación.

55

[0017] En un aspecto adicional, la invención se dirige a un conjugado inmunogénico que comprende: a) un sacárido, oligosacárido, polisacárido, péptido, polipéptido o proteína y b) una proteína neumolisina (PLY) mutante aislada como se ha descrito anteriormente.

60

[0018] El sacárido, oligosacárido o polisacárido del conjugado inmunogénico puede derivar de *Streptococcus pneumoniae*.

[0019] En un aspecto adicional, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada y purificada

65

que comprende una secuencia de ácido nucleico a) que codifica una proteína neumolisina (PLY) mutante como se describe anteriormente o b) que es complementaria a la secuencia de ácido nucleico definida en a).

5 **[0020]** Aún en un aspecto adicional, la invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende cualquiera de las secuencias de ácido nucleico anteriores aisladas y purificadas que codifican una proteína PLY mutante, así como una célula huésped recombinante transformada o infectada con dicho vector de expresión recombinante.

10 **[0021]** En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de producción de un mutante aislado de la proteína neumolisina (PLY) de la invención, comprendiendo el procedimiento: a) transformar, transfectar o infectar una célula huésped con un vector de expresión recombinante como se describe anteriormente y cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la expresión de dicha proteína PLY mutante por la célula huésped y b) recuperar la proteína PLY mutante a partir del cultivo.

15 **[0022]** Aún en otro aspecto adicional, se proporciona una composición inmunogénica que comprende: a) una proteína neumolisina (PLY) mutante aislada de la invención, en forma no conjugada o como parte de un conjugado inmunogénico como se describe anteriormente y b) uno o más adyuvantes, diluyentes o vehículos fisiológicamente aceptables.

20 **[0023]** Por tanto, la composición inmunogénica puede comprender: a) un conjugado inmunogénico que comprende: i) un sacárido, oligosacárido o polisacárido derivado de estreptococo, p. ej., de *Streptococcus pneumoniae* y ii) una proteína neumolisina (PLY) mutante aislada como se describe anteriormente y b) uno o más de entre un adyuvante, diluyente o vehículo fisiológicamente aceptable. La composición puede comprender diversos subtipos de sacáridos, oligosacáridos o polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*.

25 **[0024]** En otro aspecto, la invención se dirige al uso de cualquiera de las proteínas PLY mutantes aisladas o conjugados inmunogénicos de la invención en la preparación de una composición inmunogénica. La invención también proporciona un procedimiento de preparación de una composición inmunogénica que comprende el paso de mezclar una proteína mutante o conjugado inmunogénico de la invención con un vehículo farmacéuticamente
30 aceptable.

[0025] Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden usarse para la profilaxis o tratamiento de la infección bacteriana. En particular, son útiles para la profilaxis o tratamiento de la infección por bacterias que tienen citolisinas dependientes de colesterol (véase p. ej., Palmer, 2001), las cuales presentan reactividad cruzada
35 inmunológica con PLY; es decir, que son capaz de unirse a anticuerpos que se unirán a PLY. Preferiblemente, las bacterias son del género *Streptococcus*, preferiblemente *Streptococcus pneumoniae*.

[0026] En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una proteína PLY mutante aislada o un conjugado inmunogénico de la invención para su uso en un procedimiento de tratamiento médico.

40 **[0027]** Aún en un aspecto adicional, la invención está dirigida a un procedimiento de preparación de una composición inmunogénica, comprendiendo el procedimiento los pasos de: proporcionar una proteína PLY mutante aislada como se describe en este documento, y conjugar la proteína mutante con un sacárido, oligosacárido, polisacárido, péptido, polipéptido o proteína. La proteína mutante del procedimiento anterior puede conjugarse con
45 un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*. El procedimiento puede comprender el paso adicional de mezclar el conjugado obtenido de este modo con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de las Figuras

50 **[0028]**

En la figura 1 se muestra la secuencia de aminoácidos de la neumolisina nativa;

En la figura 2 se muestra una inmunotransferencia de los mutantes de delección de PLY detectados por el AcM PLY4;

55

En la figura 3 se muestran los resultados de un ensayo hemolítico cuantitativo en el que se compara la PLY nativa con el mutante de $\Delta 6$ PLY;

60 En la figura 4 se muestran los resultados de un ensayo citotóxico en el que se compara la PLY nativa con el mutante $\Delta 6$ PLY;

En la figura 5 se muestran las fotografías de microscopía electrónica de membranas de eritrocitos tratadas con PLY nativa;

65 En la figura 6 se muestran los niveles de IL-6 en tejido pulmonar tras el tratamiento con PLY nativa o $\Delta 6$ PLY;

En la figura 7 se muestran los niveles de IL-6 en lavado pulmonar tras el tratamiento con PLY nativa o $\Delta 6$ PLY;

5 En la figura 8 se muestran los niveles de proteína total en el lavado broncoalveolar tras el tratamiento con PLY nativa o $\Delta 6$ PLY;

En la figura 9 se muestran los niveles de anticuerpos anti-PLY en respuesta a la inmunización de ratones con PLY nativa o $\Delta 6$ PLY;

10 En la figura 10 se muestra el grado de hemólisis en relación con la concentración de toxina en SRBC (eritrocitos de cordero) tratados con la PLY nativa o el mutante de delección $\Delta A146$ PLY;

En la figura 11 se compara la actividad hemolítica de la PLY nativa y los mutantes PLY W433F, $\Delta 6$ PLY, $\Delta 7$ PLY, $\Delta 8$ PLY e $\Delta A146$ PLY;

15 En la figura 12 se muestra la citotoxicidad sobre fibroblastos L929 murinos de la PLY nativa y los mutantes PLY W433F, $\Delta 6$ PLY, $\Delta 7$ PLY, $\Delta 8$ PLY e $\Delta A146$ PLY;

20 En la figura 13 se muestra que $\Delta A146$ PLY no produce desgranulación de los mastocitos RBL-2H3, mientras que la PLY nativa si lo hace;

En la figura 14 se muestra el análisis de la temperatura corporal interna tras el tratamiento con PLY nativa o $\Delta A146$ PLY.

25 Descripción detallada de la invención

[0029] PLY es un miembro del grupo de citolisinas dependientes de colesterol (CDC). La secuencia de aminoácidos de la neumolisina nativa se recoge en la figura 1. En esta figura también se indica el número de identificación de la secuencia de GenBank derivado del NCBI-GenBank Flat File Release 141.0 con fecha 15 de abril
30 de 2004.

[0030] La presente invención depende de la identificación de varias formas de PLY que tienen una mutación dentro de la región de los aminoácidos 144 a 151 de la proteína PLY nativa, las cuales tienen toxicidad reducida como refleja una reducción de la actividad hemolítica y/o de la oligomerización. La secuencia consenso de esta
35 región es la siguiente: VPARMQYE (véase la figura 1).

[0031] El mutante tiene una delección de uno o más aminoácidos dentro de la región de los aminoácidos 144 a 151.

40 **[0032]** Por tanto, en todos los aspectos de la invención, la neumolisina mutante puede tener una delección en uno o más de los aminoácidos 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 o 151 de la secuencia nativa.

[0033] Las proteínas PLY mutantes pueden diferir de la proteína nativa en la delección de dos aminoácidos adyacentes dentro de la región de los aminoácidos 144 a 151 de la secuencia nativa. Ejemplos de estos doble
45 mutantes son aquellos que contienen sustituciones o deleciones de los aminoácidos valina 144 y prolina 145, alanina 146 y arginina 147, metionina 148 y glutamina 149 o tirosina 150 y ácido glutámico 151.

[0034] Estas proteínas PLY mutantes se usan *per se* en composiciones inmunogénicas junto con uno o más adyuvantes, diluyentes o vehículos fisiológicamente aceptables.

50 **[0035]** Alternativamente, estas proteínas PLY mutantes están conjugadas con un sacárido, oligosacárido, polisacárido, péptido, polipéptido o proteína del mismo organismo o de un organismo heterólogo, para formar conjugados que se usan en composiciones inmunogénicas, junto con uno o más de entre un adyuvante, diluyente o vehículo fisiológicamente aceptable. Por tanto, el sacárido, oligosacárido, polisacárido, péptido, polipéptido o
55 proteína al cual está conjugada la PLY mutante puede ser de estreptococo, p. ej., de *Streptococcus pneumoniae*. Pueden derivar de la cápsula bacteriana.

[0036] En forma conjugada o sin conjugar, las proteínas PLY mutantes contenidas en las composiciones inmunogénicas son útiles para profilaxis o terapia.

60 **[0037]** Tanto en forma conjugada como sin conjugar, las proteínas PLY mutantes pueden además comprender al menos una sustitución o delección de aminoácidos al menos en una de las regiones de aminoácidos 257-297, 367-397 o 424-437 de la secuencia nativa. Estas sustituciones o deleciones adicionales se describen en la solicitud de patente internacional publicada WO 90/06951 de Paton y col.

65

[0038] Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una composición inmunogénica que comprende una proteína PLY mutante aislada como se describe en este documento. En una realización, la composición inmunogénica es una composición inmunogénica de *Streptococcus pneumoniae*.

5 **[0039]** Las proteínas PLY mutantes pueden retener su actividad inmunogénica en mamíferos. Por «inmunogénica en mamíferos» se entiende que los sistemas inmunitarios de mamíferos producirán anticuerpos frente a la proteína PLY mutante y que estos anticuerpos también reconocerán a la proteína PLY nativa. De forma similar, los anticuerpos de mamíferos frente a la proteína PLY nativa reconocerán también la proteína PLY mutante. Preferiblemente, la proteína mutante es inmunogénica en humanos. Preferiblemente, la proteína PLY mutante
10 estimulará el sistema inmunitario del mamífero para producir anticuerpos que se unan a la secuencia VPARMQYEKITAHSMEQL o VPARMQYE nativa.

[0040] En una realización, la mutación está en la región de la proteína PLY implicada en la oligomerización de la proteína nativa.

15 **[0041]** Sin estar ligado a la teoría, se considera que la proteína PLY mutante presenta toxicidad reducida como resultado de la reducción de la actividad de formación de poros en comparación con la proteína PLY nativa. Se considera que esto está asociado con la reducción de la actividad de oligomerización y/o la reducción de la actividad hemolítica. La toxicidad puede medirse directamente. De forma alternativa, puede medirse uno o más
20 actividades de entre formación de poros, oligomerización y hemólisis para proporcionar una indicación de la probabilidad de toxicidad.

[0042] Las deleciones y sustituciones son ejemplos de mutaciones que pueden usarse para proporcionar las proteínas PLY mutantes con reducción de la toxicidad. Las sustituciones no conservadoras pueden ser
25 especialmente adecuadas para una reducción adicional de la toxicidad del mutante de PLY, ya que es menos probable que mantenga los niveles funcionales nativos con una mutación no conservadora que con una sustitución conservadora.

[0043] Una sustitución conservadora puede definirse como una sustitución dentro de una clase de aminoácidos y/o una sustitución que puntúa positivo en la matriz BLOSUM62 como se muestra a continuación, por tanto, una sustitución no conservadora puede definirse como una sustitución entre clases de aminoácidos o que no
30 puntúa positivo en la matriz BLOSUM62.

[0044] Según una clasificación, las clases de aminoácidos son ácidos, básicos, polares sin carga y no polares, donde los aminoácidos ácidos son Asp y Glu, los aminoácidos básicos son Arg, Lys e His, los aminoácidos polares sin carga son Asn, Gln, Ser, Thr y Tyr y los aminoácidos no polares son Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met, Trp y Cys.

[0045] Según otra clasificación, las clases de aminoácidos son hidrófilos pequeños, ácidos/acidamidas/hidrófilos básicos, hidrófobos pequeños y aromáticos, donde los aminoácidos hidrófilos pequeños son Ser, Thr, Pro, Ala y Gly; los aminoácidos ácidos/acidamidas/hidrófilos son Asn, Asp, Glu y Gln, los aminoácidos básicos son His, Arg y Lys; los aminoácidos hidrófobos pequeños son Met, Ile, Leu y Val y los aminoácidos aromáticos son Phe, Tyr y Trp.

45 **[0046]** Las sustituciones conservadoras, que puntúan positivo en la matriz BLOSUM62 son las siguientes:

Resto original	C	S	T	P	A	G	N	D	E	Q	H	R	K	M	I	L	V	F	Y	W
Sustitución	-	T A N	S	-	S	-	S D H	N E	D Q K	E R K	N Y	Q K	E Q R	IL V	M L V	M I V	M IL	Y W	H F W	F Y

[0047] La proteína neumolisina mutante de la invención tiene al menos el 80% de identidad de aminoácidos con la secuencia nativa, como se muestra en la figura 1. El mutante puede tener al menos el 85% de
50 identidad, al menos el 90% de identidad o al menos el 95% de identidad con la secuencia nativa.

[0048] El porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia de referencia, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es
55 necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Los valores de % de identidad pueden determinarse mediante WU-BLAST-2 (Altschul y col., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)). WU-BLAST-2 utiliza varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen como valores predeterminados. Los parámetros ajustables se configuran con los siguientes valores: extensión del solapamiento =1, fracción de solapamiento =
60 0,125, umbral de palabra (T) = 11. El valor del % de identidad de secuencia de aminoácidos se determina mediante el número de restos idénticos coincidentes según WU-BLAST-2, dividido entre el número total de restos de la secuencia de referencia (ignorando los huecos introducidos por WU-BLAST-2 en la secuencia de referencia para

maximizar la puntuación del alineamiento) multiplicado por 100.

[0049] El porcentaje (%) de similitud de aminoácidos se define de la misma forma que la identidad, a excepción de que se cuentan los restos que puntúan positivo en la matriz BLOSUM62. Por tanto, los restos que no son idénticos pero tienen propiedades similares (p. ej., como resultado de sustituciones conservadoras) también se cuentan.

[0050] En otro aspecto de la presente invención, la proteína PLY mutante se conjuga con un sacárido, oligosacárido, polisacárido, péptido, polipéptido o proteína para formar un conjugado inmunogénico. En este aspecto, la proteína PLY mutante puede retener su inmunogenicidad, o esta inmunogenicidad puede eliminarse. En cualquier caso, la proteína PLY mutante sirve para potenciar la inmunogenicidad del sacárido, oligosacárido, polisacárido, péptido, polipéptido o proteína en el conjugado.

[0051] Estos sacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, péptidos, polipéptidos o proteínas se conjugan cada uno con la proteína PLY mutante en cualquier forma adecuada, incluyendo pero sin limitaciones: 1) conjugación directa a través de grupos funcionales de la proteína (p. ej., enlace tiol-tiol, enlace amino-carboxilo, enlace amino-aldehído, conjugación directa con enzima), 2) conjugación homobifuncional de aminas (p. ej., usando bis-aldehídos); 3) conjugación homobifuncional de tioles (p. ej., usando bis-maleimidias); 4) conjugación homobifuncional mediante reactivos fotoactivados, 5) conjugación heterobifuncional de aminas a tioles (p. ej., usando maleimidias); 6) conjugación heterobifuncional mediante reactivos fotoactivados (p. ej., la familia de β -carbonildiazos); 7) introducción de grupos amino reactivos en un poli u oligosacárido mediante activación con bromuro de cianógeno o carboximetilación; 8) introducción de grupos reactivos de tiol en un poli u oligosacárido mediante un compuesto heterobifuncional como la maleimidohidrazida; 9) conjugación proteína-lípido a través de la introducción de un grupo hidrófobo en la proteína y 10) conjugación proteína-lípido a través de la incorporación de un grupo reactivo en el lípido. También, se contemplan técnicas heterobifuncionales de «conjugación no covalente» como la interacción entre biotina y avidina. Para una revisión más exhaustiva de las técnicas de conjugación, consulte Aslam y Dent (1998).

[0052] Procedimientos adicionales de conjugación de un péptido, polipéptido o proteína a una proteína se describen en los documentos U.S. 2007/0134762 y U.S. 2007/0161008, presentados ambos el 17 de diciembre de 2003.

[0053] Adicionalmente, en la patente de EE. UU. 5.565.204 de Kuo y col., se describe un procedimiento para la conjugación de dichos polisacáridos con la proteína PLY nativa; este procedimiento también es adecuado para conjugar dichos polisacáridos a las proteínas PLY mutantes de esta invención.

[0054] Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden ser composiciones inmunogénicas conjugadas. Cada composición inmunogénica puede comprender uno o más sacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, péptidos, polipéptidos o proteínas, que pueden derivar del organismo original (*S. pneumoniae*) de la proteína PLY nativa. En ejemplos no limitantes, estos componentes pueden derivar de la cápsula del organismo.

[0055] En una realización, los sacáridos, oligosacáridos o polisacáridos derivan de más de un serotipo de *S. pneumoniae*, los serotipos en particular dependerán del uso previsto para la composición inmunogénica y la prevalencia de estos serotipos en la población diana.

[0056] Alternativamente, los sacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, péptidos, polipéptidos o proteínas derivan de un organismo heterólogo (es decir, un organismo distinto de *S. pneumoniae*). En el caso de sacáridos, oligosacáridos o polisacáridos, pueden obtenerse múltiples serotipos de, entre otros, *Neisseria meningitidis* (por ejemplo, de los serotipos A, C, Y y W135), *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*.

[0057] En determinados aspectos de la invención, la proteína PLY mutante se conjuga con otro péptido, polipéptido o proteína de *S. pneumoniae*. Alternativamente, la proteína PLY mutante se conjuga con un péptido, polipéptido o proteína de un organismo heterólogo, incluyendo un ser humano. Por ejemplo, la proteína PLY mutante se conjuga con otro péptido, polipéptido o proteína, que procede de un virus, bacteria, hongo o parásito patógeno, 2) de una célula cancerosa o célula tumoral, 3) de un alérgeno de modo que interfiera con la producción de IgE para moderar así las respuestas alérgicas al alérgeno o 4) de una proteína precursor amiloide (APP) para prevenir o tratar la enfermedad caracterizada por la deposición amiloide en un huésped vertebrado.

[0058] El resto de APP que se conjuga a la proteína PLY mutante puede ser el péptido β -amiloide (también denominado péptido A β) que es un fragmento interno de 39-43 aminoácidos de (APP), el cual se genera mediante el procesamiento de APP por las enzimas secretasas β y γ . Un ejemplo de este péptido es el péptido A β 1-42, que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His

Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala

[0059] El componente A β puede proporcionarse además en forma de fragmento conjugado con la proteína PLY mutante. Entre los ejemplos no limitantes de dichos fragmentos se incluyen A β 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-11, 1-10 y 1-12. El uso de A β y de fragmentos del mismo, como conjugados a proteínas distintas de PLY, se describe en las solicitudes de patente internacional publicadas WO 99/27944 y WO 00/72880.

[0060] Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un procedimiento de profilaxis o tratamiento para un mamífero, comprendiendo el procedimiento el paso de administrar a un sujeto mamífero una composición inmunogénica que comprende una proteína PLY aislada que tiene una mutación como se describe en este documento, donde la proteína PLY mutante está conjugada o no como se describe en este documento. Típicamente, el procedimiento está destinado a la profilaxis o tratamiento de la infección por una o más especies o cepas de bacterias que tienen una citolisina dependiente de colesterol que presenta reacción inmunológica cruzada con la neumolisina nativa especialmente de *Streptococcus y*, en particular de *Streptococcus pneumoniae*. Entre otras especies y sus citolisinas se incluyen *Clostridium perfringens* (perfringolisina O), *Streptococcus intermedius* (intermedilisina), *Bacillus alvei* (alveolisina), *Bacillus anthracis* (antrolisina), *Bacillus cereus* (cereolisina), *Listeria ivanovii* (ivanolisina O), *Clostridium novyi* (novilisina), *Arcanobacterium pyogenes* (piolisina), *Listeria seeligeri* (seeligerolisina O), *Clostridium septicum* (septicolisina), *S. pyogenes* (estreptolisina O), *Streptococcus suis* (suilisina), *Clostridium tetan* (tetanolisina), *Listeria monocytogenes* (listeriolisina O), *Streptococcus equisimilis* (estreptolisina O), *S. canis* (estreptolisina O), *Bacillus thuringiensis* (turingiolisina O), *B. laterosporus* (laterosporolisina O), *Clostridium botulinum* (botulinolisina), *C. chauvoei* (chauveolisina), *C. bifermentans* (bifermentolisina), *C. sordellii* (sordellilisina) (véase p. ej., Palmer 2001).

[0061] Una composición inmunogénica de la invención, tanto de la proteína PLY mutante sola o como parte de un conjugado inmunogénico, puede formularse para su administración mediante cualquier vía adecuada que suministra una cantidad inmunoprotectora de la proteína al sujeto. Una de esta vía es la vía parenteral, como mediante administración intramuscular o subcutánea. También pueden emplearse otros modos de administración, cuando se desee, como la vía mucosa, como la administración por vía oral, rectal, bucal o intrasnal o a través de otras vías parenterales, es decir, intradérmica o intravenosa.

[0062] Generalmente, la composición inmunogénica se presentará normalmente como una formulación farmacéutica que incluye un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable, por ejemplo, agua estéril o solución isotónica estéril, así como cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, compatibles con la administración a humanos. El vehículo apropiado será evidente para los expertos en la técnica y dependerá en gran parte de la vía de administración. La composición inmunogénica de la presente invención también puede incluir un diluyente fisiológicamente aceptable como agua estéril o solución salina isotónica estéril. La formulación puede prepararse por medios convencionales.

[0063] Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico para cualquier mamífero receptor en especial dependerá de diversos factores como edad, estado de salud general y sexo; la hora de administración, la vía de administración, los efectos sinérgicos con cualquier otro fármaco administrado y el grado de protección buscado. Por supuesto, la administración puede repetirse a intervalos adecuados, si es necesario.

[0064] El mamífero puede ser un ser humano o puede ser un mamífero no humano. La composición inmunogénica puede formularse para su administración de cualquier manera conveniente, por ejemplo, aquellas descritas anteriormente.

[0065] La composición inmunogénica de la presente invención puede incluir uno o más adyuvantes fisiológicamente aceptables. Una sustancia que potencia la respuesta inmunitaria cuando se administra junto con un inmunógeno o un antígeno se conoce como adyuvante. Diversas citoquinas o linfoquinas han mostrado actividad moduladora del sistema inmunitario y, por tanto, pueden usarse como adyuvantes incluyendo, entre otras, las interleuquinas 1- α , 1- β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 (véase, p. ej., la patente de EE. UU. N.º 5.723.127), 13, 14, 15, 16, 17 y 18 (y sus formas mutantes), los interferones- α , β y γ , factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF; véase la patente de EE. UU. N.º 5.078.996 y número de acceso de la ATCC 39900), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y los factores de necrosis tumoral α y β . Entre otros adyuvantes útiles en esta invención se incluyen una quimioquina, entre otras, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES. También pueden ser útiles como adyuvantes las moléculas de adhesión, como una selectina, p. ej., L-selectina, P-selectina y E-selectina. Aún entre otros adyuvantes útiles se incluyen, sin limitaciones, una molécula similar a la mucina, p. ej., CD34, GlyCAM-1 y MadCAM-1, un miembro de la familia de las integrinas, como LFA-1, VLA-1, Mac-1 y p150.95, un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, como PECAM, ICAM, p. ej. ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, CD2 y LFA-3, moléculas coestimulantes como CD40 y CD40L, factores de crecimiento como factor de crecimiento vascular, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento epidérmico, B7.2, PDGF, BL-1 y factor de crecimiento vascular endotelial,

moléculas receptoras como Fas, receptor del TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6. Aún entre otras moléculas adyuvantes se incluyen la caspasa (ICE). Véanse también las publicaciones de patente internacionales N.º WO98/17799 y WO99/43839.

- 5 **[0066]** Entre los adyuvantes adecuados utilizados para potenciar una respuesta inmunitaria adicional se incluyen, sin limitaciones, MPL™ (lípidio A monofosforil 3-O-deacilado; Corixa, Hamilton, MT) que se describe en la patente de EE. UU. N.º 4.912.094. También son adecuados para su uso como adyuvantes análogos de lípidio A sintético o compuestos aminoalquil glucosaminasa fosfato (AGP), o derivados o análogos del mismo, que están disponibles en Corixa (Hamilton, MT) y que se describen en la patente de Estados Unidos N.º 6.113.918.
- 10 estos AGP es el 2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoilamino] etil 2-deoxi-4-O-fosfono-3-O-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil]-2-[(R)-3-tetradecanoiloxitetradecanoil-amino]-β-D-glucopiranosido, que también se conoce como 529 (anteriormente conocido como RC529). Este adyuvante 529 se formula como una forma acuosa o una emulsión estable.
- 15 **[0067]** Aún entre otros adyuvantes se incluyen emulsiones de aceite mineral y agua, sales de aluminio (Alum) como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, etc., Amphigen, Avridine, L121/escualeno, D-lactida-polilactida/glucósido, polioles plurónicos, dipéptido de muramilo, *Bortedella* inactivada, saponinas, como Stimulona™ QS-21 (Antigenics, Framingham, MA.), descrita en la patente de EE. UU. N.º 5.057.540 y partículas generadas a partir de estos, como ISCOMS (complejos inmunoestimulantes), *Mycobacterium tuberculosis*,
- 20 lipopolisacáridos de bacterias, polinucleótidos sintéticos como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (patente de EE. UU. N.º 6.207.646) una toxina pertussis (TP) o una toxina termolábil de *E. coli* (TL), especialmente LT-K63, LT-R72, PT-K9/G129, véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente internacional N.º WO 93/13302 y WO 92/19265.
- 25 **[0068]** También son adyuvantes útiles las toxinas del cólera y mutantes de las mismas, como aquellos descritos en la solicitud de patente internacional publicada N.º WO 00/18434 (en la que el ácido glutámico en la posición del aminoácido 29 se sustituye por otro aminoácido (distinto del ácido aspártico, preferiblemente una histidina)). Toxinas o mutantes de TC similares se describen en la solicitud de patente internacional publicada número WO 02/098368 (donde la isoleucina de la posición del aminoácido 16 se sustituye por otro aminoácido, solo
- 30 o en combinación con la sustitución de la serina de la posición del aminoácido 68 por otro aminoácido y/o donde la valina en la posición del aminoácido 72 se sustituye por otro aminoácido). Otras toxinas TC se describen en la solicitud de patente internacional publicada número WO 02/098369 (donde la arginina de la posición del aminoácido 25 se sustituye por otro aminoácido y/o un aminoácido se inserta en la posición del aminoácido 49; y/o dos aminoácidos se insertan en las posiciones de aminoácidos 35 y 36).
- 35 **[0069]** La actividad hemolítica de la proteína PLY mutante puede determinarse de una manera adecuada. Un protocolo en particular según se usa en la presente invención es la siguiente: la toxina se preparó en diluciones seriadas en 1,5 ml PBS1x (Oxoid). Se añadió un volumen igual de SRBC (eritrocitos de carnero) al 2% (vol/vol) a cada dilución y se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación, las soluciones se centrifugaron a
- 40 3.000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las membranas de SRBC o las células enteras. El contenido en hemoglobina del sobrenadante se leyó a una D.O. de 540 nm y se representó frente a la concentración de toxina para obtener el grado de hemólisis en relación con la concentración de toxina. Una D.O. a 540 nm de 0,5 = lisis del 50%.
- 45 **[0070]** Preferiblemente la proteína mutante no es hemolítica a concentraciones de más de 1 µg/ml; más preferiblemente a concentraciones de más de 5 µg/ml; aún más preferiblemente a más de 10 µg/ml, a más de 25 µg/ml o a más de 35 µg/ml y, más preferiblemente a más de 50 µg/ml. La determinación de la hemólisis puede llevarse a cabo como se describe anteriormente.
- 50 **[0071]** La determinación de la actividad de formación de poros puede ser determinado de cualquier forma adecuada, un protocolo preferido depende de la inspección visual de las membranas de los SRBC mediante microscopía electrónica; esto permite que se visualice el número de poros. Este protocolo se describe con más detalle a continuación.
- 55 **[0072]** Pueden emplearse varios procedimientos para analizar la actividad de oligomerización de las toxinas que forman poros. Por ejemplo, puede usarse ultracentrifugación analítica, como se describe en Morgan y col. (1993) para estudiar la oligomerización de toxinas en solución. Puede aplicarse un gradiente de densidad de sacarosa a los eritrocitos unidos a la toxina en el que se observan oligómeros en las fracciones de alto peso molecular y separados de otras proteínas de la membrana de los eritrocitos (Bhakdi y col., 1985; Saunders y col.,
- 60 1989).
- [0073]** Un procedimiento específico para comparar la actividad de oligomerización de la PLY mutante en solución con la de PLY nativa es usar un ensayo de fluorescencia realizado de forma similar al descrito por Search (2002). Brevemente, el ANS (ácido 8-anilino-1-naftalen-sulfónico) (Kodak Ltd.) se une como fluoróforo extrínseco
- 65 a PLY. En solución acuosa, ANS tiene una fluorescencia débil a 490 nm (leído con un espectrofluorómetro JASCO

FP-750), pero en un entorno hidrófobo aumenta la fluorescencia de este compuesto. Este fenómeno permite seguir en la solución el movimiento de los monómeros de PLY unidos a ANS. El desoxicolato sódico (suministrado por BDH Laboratory) puede usarse para inducir la oligomerización de la neumolisina. Se observa un aumento de la fluorescencia cuando la PLY nativa más ANS se trata con desoxicolato sódico ya que la toxina se autoasocia
 5 llevando al ANS de un entorno hidrófilo a un entorno hidrófobo. La PLY derivatizada, es decir la PLY modificada químicamente con ditio(bis)nitrobenzoato para que permanezca monomérica, no produce un aumento en la fluorescencia a 490 nm cuando se trata con desoxicolato sódico. A partir de este experimento, se prevé que la PLY mutante de el mismo resultado que la PLY derivatizada si permanece en estado monomérico. Si se encuentra que la PLY mutante presenta el mismo grado de fluorescencia que la PLY nativa, entonces puede concluirse que la PLY
 10 mutante se convierte en oligómero.

[0074] La toxicidad de las proteínas y composiciones de la invención puede determinarse directamente, administrando el mutante a un mamífero experimental no humano como, p. ej., un roedor. La toxicidad del mutante puede compararse con la de la proteína nativa. Entre los indicadores de toxicidad adecuados, se
 15 incluyen supervivencia, comportamiento animal e inflamación (que puede determinarse mediante la producción de citoquinas inflamatorias, por ejemplo, en el lavado broncoalveolar). Los protocolos adecuados se describen a continuación en los ejemplos.

[0075] La presente invención además proporciona un procedimiento de preparación de una
 20 composición inmunogénica, comprendiendo los pasos de:

proporcionar una proteína PLY mutante aislada con las mutaciones descritas en este documento y con reducción de la actividad hemolítica en comparación con la proteína PLY nativa, siendo la proteína mutante antigénica en mamíferos, y

25 conjugar la proteína mutante con un sacárido, oligosacárido, polisacárido, péptido, polipéptido o proteína.

[0076] Según un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una secuencia de ácido nucleico aislada y purificada que comprende una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica una proteína neumolisina (PLY) mutante o que es complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico, siendo la proteína mutante inmunogénica en mamíferos. Aspectos adicionales de la invención proporcionan secuencias de ácido nucleico que son complementarias a estas secuencias.

[0077] Las secuencias de ácido nucleico pueden derivar de secuencias de proteínas en base a la
 35 degeneración del código genético.

[0078] Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden comprender secuencias reguladoras adicionales, por ejemplo, promotores o represores. Las secuencias de ácido nucleico pueden estar comprendidas en un vector de expresión, por ejemplo, plásmidos, cromosomas artificiales, casetes de expresión y
 40 similares.

[0079] Según aún un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una célula huésped recombinante que comprende un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico aislada y purificada que expresa una proteína PLY mutante como se describe en este documento. En una
 45 realización, la célula es una célula procarionta.

[0080] La invención descrita en este documento se refiere a mutantes de delección de neumolisina que muestran toxicidad, hemólisis y formación de poros reducidas. Los datos muestran que a 7 µg/dosis, Δ6 PLY no es nociva en ratones en comparación con 2 µg/dosis de PLY nativa.

50 **[0081]** No obstante, diversas mutaciones generadas por los presentes inventores alrededor del resto N₁₄₃ y descritas en este documento siguen siendo reconocidas por inmunotransferencia con AcM PLY 4, lo que indica que este sitio altamente antigénico en PLY no se ha visto alterado. Se ha demostrado que el sitio de mutación es altamente antigénico mediante selección de epítipo y es reconocido tanto por sueros humanos como por sueros hiperinmunes de conejo (Salo y col., 1993).
 55

[0082] Todos los mutantes creados fueron confirmados como formas de neumolisina. El hecho de que el AcM PLY4 reconozca los mutantes indica que el epítipo no se ha visto alterado hasta el grado que ya no sea específico para este anticuerpo. Delecciones mayores en esta área podrían crear mutantes que no fueron reconocidos por el AcM PLY4. Puesto que esta región ha sido identificada como altamente inmunogénica (Salo y col., 1993) es útil que el sitio siga intacto en las delecciones creadas en términos de su uso en composiciones inmunogénicas.
 60

[0083] Los mutantes no tóxicos descritos en este documento están dentro del sitio propuesto como
 65 implicado en la oligomerización (de los Toyos y col., 1996). La caracterización adicional *in vitro* de un toxoide

purificado, $\Delta 6$ PLY, mostró que no era citotóxico para fibroblastos o eritrocitos murinos. Esto sugiere que las membranas de las células huésped no se lisan con $\Delta 6$ PLY ya que se previene la oligomerización (formación de poro). Los poros en las membranas de SRBC tratados con PLY nativa son fácilmente visibles aunque no se han observado poros en las membranas tratadas con $\Delta 6$ PLY. Se observaron dificultades en la fijación de las membranas tratadas con $\Delta 6$ PLY a las rejillas para su visualización con el ME. Esto puede ser debido a la aglutinación de membranas que se ha visto en los ensayos hemolíticos con $\Delta 6$ PLY. El efecto de la hemaglutinación observado en los ensayos hemolíticos de $\Delta 6$ PLY con SRBC sugiere que los monómeros de $\Delta 6$ PLY siguen unidos a las membranas de la célula huésped. Se creó una forma marcada de $\Delta 6$ PLY que permitía la visualización de la unión a las membranas de la célula huésped. A partir de los ensayos de unión (datos no mostrados) se confirmó que $\Delta 6$ PLY no se unía a la membrana de la célula huésped. Puede que exista una débil afinidad entre los monómeros $\Delta 6$ PLY, lo que permite un entrecruzamiento de monómeros pero no la formación de oligómeros reales. Este entrecruzamiento de los monómeros de $\Delta 6$ PLY además de la unión de los monómeros a eritrocitos podría crear la matriz observada en las placas de 96 pocillos. Se propuso que creando el mutante $\Delta 6$ PLY, el estadio de oligomerización se bloqueaba aunque no se eliminaba la unión/reconocimiento de la célula huésped.

[0084] Esta hipótesis está apoyada por el hallazgo de que $\Delta 146$ PLY sigue siendo capaz de asociarse con las membranas celulares según se determina usando versiones de eGFP etiquetadas de las proteínas mutantes y nativa pero esta $\Delta 146$ PLY no forma poros en las membranas celulares. En su lugar, se observan cadenas largas de proteínas en la superficie celular, que pueden ser una proteína autoasociada que es incapaz de formar oligómeros correctamente para formar poros.

[0085] El tratamiento *in vivo* con $\Delta 6$ PLY no producía aumento de la citoquina inflamatoria IL-6 24 horas después del tratamiento. Se encontró que los ratones tratados con PLY nativa producían 10 veces más IL6 que el control con solución salina y con $\Delta 6$ PLY. Los datos establecieron que el tratamiento con $\Delta 6$ PLY no inducía los efectos secundarios inflamatorios que se asocian con la PLY nativa. El tratamiento con la PLY nativa daba lugar a una respuesta inflamatoria localizada en el lugar de administración. Esta producción de IL-6 localizada en el lavado broncoalveolar probablemente procede de los neutrófilos reclutados (Kadioglu, 2000) y de los macrófagos alveolares que producen más IL-6 que las células epiteliales del tejido pulmonar (Kerr, comunicación personal 2003).

[0086] La PLY nativa dañaba gravemente la integridad pulmonar, aunque los pulmones tratados con $\Delta 6$ PLY permanecían sanos. La gran cantidad de proteína total observada en las vías respiratorias de ratones tratados con PLY nativa se ha caracterizado como una entrada de proteínas del huésped (Rubins y Janoff, 1998). PLY ha sido implicada previamente en la interrupción de las uniones estrechas (Rayner y col., 1995), lo que permite a las proteínas del huésped «filtrarse» dentro de las vías respiratorias a través de la interrupción de la barrera capilar/de la vía respiratoria. Una baja respuesta inflamatoria y la no afectación de los pulmones por $\Delta 6$ PLY se correlaciona con la incapacidad de $\Delta 6$ PLY para crear oligómeros que forman poros en las membranas de la célula huésped.

[0087] Se ha demostrado que el tratamiento de los ratones con PLY nativa produce una respuesta hipotérmica mantenida que no se observa en los animales tratados con $\Delta 146$ PLY.

[0088] Estos y otros aspectos de la presente invención se describirán mediante los siguientes ejemplos no limitantes y en referencia a las figuras acompañantes.

45 **Ejemplos**

Ejemplo 1

Mutagénesis dirigida a sitio de la neumolisina

[0089] Se crearon ocho deleciones de aminoácidos dobles a partir de la neumolisina nativa usando el kit de mutagénesis dirigida a sitio Quikchange® (Stratagene). El plásmido molde fue el vector de alta expresión pKK233-3 (Clontech Laboratories) en el que se insertó previamente PLY. Los cebadores diseñados para eliminar los aminoácidos relevantes (véase a continuación la tabla 1) se obtuvieron de Sigma-Genosys. Se crearon las siguientes deleciones para abarcar la región N₄₁₃ de PLY: W₁₃₄H₁₃₅Q₁₃₆D₁₃₇Y₁₃₈G₁₃₉Q₁₄₀V₁₄₁N₁₄₂N₁₄₃V₁₄₄P₁₄₅A₁₄₆R₁₄₇M₁₄₈Q₁₄₉Y₁₅₀E₁₅₁; donde ($\Delta 1$) W₁₃₄H₁₃₅, ($\Delta 2$) Q₁₃₆D₁₃₇, ($\Delta 3$) Y₁₃₈G₁₃₉, ($\Delta 4$) Q₁₄₀V₁₄₁, ($\Delta 5$) V₁₄₄P₁₄₅ ($\Delta 6$) A₁₄₆R₁₄₇, ($\Delta 7$) M₁₄₈Q₁₄₉, ($\Delta 8$) Y₁₅₀E₁₅₁ (véase la tabla 2). N₁₄₂N₁₄₃ fue la deleción previamente creada (Search (2000)), donde la proteinasa K corta PLY en dos fragmentos.

60

Tabla 1: cebadores usados para crear deleciones de aminoácidos dobles dentro del gen PLY

Cebadores	Secuencias de nucleótidos de los cebadores para mutagénesis dirigida a sitio
Δ1 sen	5'-CGATTTGTTGGCTAAGCAAGATTATGGTCAGG-3'
Δ1 com	5'-CCTGACCATAATCTTGCTTAGCCAACAAATCG-3'
Δ2 sen	5'-GTTGGCTAAGTGGCATTATGGTCAGGTCAATAATGTCCC-3'
Δ2 com	5'-GGGACATTATTGACCTGACCATAATGCCACTTAGCCAAC-3'
Δ3 sen	5'-GGCTAAGTGGCATCAAGATCAGGTCAATAATGTCCC-3'
Δ3 com	5'-GGGACATTATTGACCTGATCTTGATGCCACTTAGCC-3'
Δ4 sen	5'-GGCATCAAGATTATGGTAATAATGTCCCAGCTAG-3'
Δ4 com	5'-CTAGCTGGGACATTATTACCATAATCTTGATGCC-3'
Δ5 sen	5'-GGTCAGGTCAATAATGCTAGAATGCAGTATG-3'
Δ5 com	5'-CATACTGCATTCTAGCATTATTGACCTGACC-3'
Δ6 sen	5'-GGTCAATAATGTCCCAATGCAGTATGAAAAATAACGGCTC-3'
Δ6 com	5'-GAGCCGTTATTTTTTTCATACTGCATTGGGACATTATTGACC-3'
Δ7 sen	5'-GGTCAATAATGTCCCAGCTAGATATGAAAAATAACGGCTC-3'
Δ7 com	5'-GAGCCGTTATTTTTTTCATATCTAGCTGGGACATTATTGACC-3'
Δ8 sen	5'-GTCCCAGCTAGAATGCAGAAAAATAACGGCTCACAGC-3'
Δ8 com	5'-GCTGTGAGCCGTTATTTTTCTGCATTCTAGCTGGGAC-3'

Nota: los cebadores complementarios [com] son el complemento exacto y complementario de los cebadores sentido [sen] en los que se han eliminado del cebador las bases que se quieren quitar.

5 Tabla 2: bases eliminadas para cada mutación dentro del gen PLY y aminoácido eliminado

Delección	Bases eliminadas dentro del gen PLY	Aminoácidos eliminados
Δ1	TGGCAT (pb400-405)	W ₁₃₄ H ₁₃₅
Δ2	CAAGAT (pb406-411)	Q ₁₃₆ D ₁₃₇
Δ3	TATGGT (pb412-417)	Y ₁₃₈ G ₁₃₉
Δ4	GAGGTC (pb418-423)	Q ₁₉₀ V ₁₄₁
Δ5	GTCCCA (pb430-435)	V ₁₄₄ P ₁₄₅
Δ6	GCTAGA (pb436-441)	A ₁₄₆ R ₁₄₇
Δ7	ATGCAG (pb442-447)	M ₁₄₈ Q ₁₄₉
Δ8	TATGAA (pb448-453)	Y ₁₅₀ E ₁₅₁

Ejemplo 2

10

Expresión y purificación de proteínas

[0090] Las PLY nativa y mutante se expresaron en *Escherichia coli* y se recogieron como se describió previamente (Mitchell y col., 1989). Las células se disgregaron usando el homogeneizador de sobremesa (Constant Systems Ltd) y las proteínas citoplásmicas se obtuvieron mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 30 minutos. Se usó cromatografía de interacción hidrófoba con una matriz de fenil éter (PE20, Applied Biosystems) para purificar la PLY con la BioCAD (RTM) 700E Perfusion Chromatography Workstation (Applied Biosystems). Las fracciones eluidas se aplicaron en un PAGE-SDS y se tiñeron con Coomassie usando un protocolo convencional y se agruparon las fracciones que contenían la PLY pura.

20

Ejemplo 3Ensayo hemolítico cuantitativo

[0091] La actividad hemolítica de la proteína purificada se evaluó usando un ensayo en base a lo publicado por Walker y col., (1987) usando una solución de eritrocitos de cordero (SRBC) (E&O Laboratories) al 2% (vol/vol) en solución salina tamponada con fosfato 1x (PBS) (Oxoid). Las fracciones mezcladas se concentraron usando concentradores de muestras clínicas minicon B15 (Millipore). La toxina se preparó en diluciones seriadas en 1,5 ml de PBS 1x (Oxoid). Se añadió un volumen igual de SRBC al 2% (vol/vol) a cada dilución y se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación, las soluciones se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las membranas de SRBC o las células enteras. El contenido en hemoglobina del sobrenadante se leyó a una D.O. de 540 nm y se representó frente a la concentración de toxina para obtener el grado de hemólisis en relación con la concentración de toxina. Una D.O. a 540 nm de 0,5 = lisis del 50%.

30

[0092] El análisis hemolítico macroscópico mostró que cuatro de estos mutantes, las delecciones 5-8, no eran hemolíticos. Los análisis adicionales de $\Delta 6$ PLY ($A_{146}R_{147}$) purificada en un ensayo hemolítico cuantitativo (fig. 3) mostraron que no este mutante no era lítico a concentraciones de 50 $\mu\text{g/ml}$ mientras que <1 $\mu\text{g/ml}$ de PLY nativa eran hemolíticos en SRBC. Se observó que las preparaciones purificadas de $\Delta 5$ PLY y $\Delta 6$ PLY aglutinaban los eritrocitos en microplatas de valoración de 96 pocillos pero no lisaban las células; se observó que este efecto dependía de la concentración.

Ejemplo 4

10

Microscopía electrónica

[0093] Se incubaron 200 μl de solución de SRBC al 2% (v/v) con un volumen igual de PLY nativa o $\Delta 6$ PLY a 0,2 mg/ml a 37°C durante 20 minutos y, a continuación, se centrifugó en una centrifuga de mesa para sedimentar las membranas de los SRBC. Las membranas se lavaron con H_2O tres veces y se resuspendieron en 100 μl de H_2O . Se fijaron 5 μl de suspensión en gradillas recubiertas de carbono y se tiñeron negativamente con ácido fosfotúngstico a 1%, pH 6,8. El aumento era de x25.000 usando un microscopio electrónico de transmisión con filtro de energía LEO 912.

[0094] Se visualizaron poros de 30-40 μm en las membranas de los eritrocitos tratados con PLY nativa a 0,2 mg/ml (fig. 5). Por el contrario, no se visualizaron poros en las membranas tratadas con $\Delta 6$ PLY a 0,2 mg/ml.

Ejemplo 5

25

Inmunotransferencia

[0095] Los mutantes de PLY creados por mutagénesis dirigida a sitio se detectaron en inmunotransferencias usando técnicas convencionales. Las transferencias se incubaron con suero policlonal anti-PLY de conejo y suero anti-PLY monoclonal PLY4 de ratón (de los Toyos y col., 1996) y, a continuación, se incubaron con el anticuerpo relevante unido a HRP (Amersham Life Sciences) y se desarrollaron.

[0096] De las ocho delecciones de aminoácidos dobles creadas, todas eran reconocidas por inmunotransferencia con el suero policlonal anti-PLY (no mostrado) y por el AcM PLY4 (figura 2) preparado por de los Toyos y col. (1996).

Ejemplo 6

Ensayo de citotoxicidad de L929

40

[0097] Los fibroblastos murinos L929 (ECACC, N.º 85011425) se cultivaron en medio RPMI 1640 + suero fetal de ternera (SFT) (Gibco) al 10%, se realizaron pases, se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h a 37°C, CO_2 al 5%. Se prepararon diluciones seriadas de toxina PLY nativa y de mutante $\Delta 6$ PLY en medio RPMI 1640 a partir de una concentración madre de 0,05 mg/ml y se añadieron a los fibroblastos L929. La viabilidad celular después de 24 h de incubación con PLY se evaluó usando MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma) que se degrada por la actividad mitocondrial en un precipitado de formazán de color morado. El MTT en los pocillos con células muertas permanecerá de color amarillo. La densidad óptica se leyó a 540 nm con un lector de placas MRX (Dynatech Laboratories).

[0098] Se desarrollaron ensayos de citotoxicidad con fibroblastos murinos L929 para evaluar la toxicidad del mutante $\Delta 6$ PLY en comparación con la PLY nativa (fig. 4). A concentraciones de 30 $\mu\text{g/ml}$, $\Delta 6$ PLY no era tóxico para los fibroblastos, mientras que < 500 $\mu\text{g/ml}$ de PLY nativa eran citotóxicos.

Ejemplo 7

55

Análisis de citoquinas *in vivo*

[0099] Ratones MF-1 de 8 semanas de vida (Harlan) se anestesiaron ligeramente con halotano al 2%/oxígeno al 1,5% (1,5 litros/min) (Zeneca). La PLY nativa sin LPS purificada se administró por vía intranasal a 2 $\mu\text{g/dosis}$ y $\Delta 6$ PLY a 7 $\mu\text{g/dosis}$ (9,928 ng de LPS/dosis) en volúmenes de 50 μl con un grupo de solución salina como control (n = 4 para cada tratamiento). El contenido en lipopolisacárico (LPS) de la toxina purificada se determinó usando el kit Kinetic-QCL (BioWhittaker) de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) que se desarrolló según las instrucciones del fabricante. Se controló a los ratones hasta el punto final a las 24 horas. Se recuperaron muestras de suero, de lavado broncoalveolar y de tejido pulmonar y se procesaron como se describió previamente (Kerr y col. 2002). Los niveles de citoquinas se determinaron con los kits de ELISA para citoquinas comerciales para

65

interleuquina (IL)-6, interferón (IFN)- γ (Pharmigen) y factor de necrosis tumoral (TNF)- α (R&D Systems, Reino Unido). Los niveles totales de proteínas en el lavado se determinaron usando un ensayo Bradford convencional.

[0100] Los análisis no paramétricos mediante la prueba Mann-Whitney U se usaron para determinar los niveles de citoquinas y proteína total donde $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los valores se expresaron como medianas de las desviaciones absolutas respecto de la mediana ± 1 (MDA) usando Statview (Abacus Concepts).

[0101] Como parte de los estudios de toxicidad *in vivo*, se determinaron los síntomas macroscópicos. Todos los ratones sobrevivieron a las 24 horas postratamiento excepto uno del grupo de PLY nativa. Los ratones tratados con $\Delta 6$ PLY y solución salina se recuperaban de la anestesia más rápidamente que los ratones a los que se administró la PLY nativa. El comportamiento de los ratones tratados con $\Delta 6$ PLY era similar al del control tratado con solución salina, pero los ratones tratados con la PLY nativa mostraron piloerección, dificultad respiratoria y postura encorvada durante un periodo de 6 horas, recuperándose a las 24 horas de escala temporal.

[0102] A continuación, se realizó un análisis de citoquinas inflamatorias. La producción de IL-6 se midió como marcador de toxicidad de PLY en el huésped. Se observó un aumento mayor de 10 veces en los niveles de IL-6 en el lavado broncoalveolar de los ratones tratados con PLY nativa (figura 7) en comparación con el tratamiento con $\Delta 6$ PLY ($p < 0,05$) y el control de solución salina ($p < 0,05$). El tratamiento con PLY nativa induce inflamación en las vías respiratorias del huésped mientras que el tratamiento con $\Delta 6$ PLY no. La mediana del nivel de IL-6 en el lavado broncoalveolar de los animales tratados con toxina nativa era de 416 pg/ml (intervalo de 335-2.225 pg/ml) mientras que el nivel basal de IL-6 era inferior (59 pg/ml) sin aumento en los ratones tratados con $\Delta 6$ PLY (36 pg/ml) (véase la tabla 3 a continuación). Se observó un aumento en los niveles de IL-6 en el tejido pulmonar de los ratones tratados con la toxina nativa ($p < 0,05$) en comparación con el control de solución salina (figura 6). No se observó un aumento significativo de IL-6 en el tejido pulmonar de ratones tratados con $\Delta 6$ en comparación con el tratamiento con solución salina. Las mediciones de IFN- γ y TNF- α no eran significativas entre tratamientos a las 24 h postadministración (datos no mostrados).

Tabla 3: mediana de los niveles de IL-6 (min-máx.) en el lavado broncoalveolar a las 24 h postratamiento.

Tratamiento (i.n.)	Tejido pulmonar (pg/ml)	Lavado pulmonar (pg/ml)	Valores de p (*=significativo)		
				Pulmón	Lavado
NaCl	117 (103-139)	59 (19-113)	NaCl/ $\Delta 6$	0,3865	0,7728
$\Delta 6$	147 (73-209)	36 (30-132)	$\Delta 6$ /nativa	0,1573	0,0339*
Nativa	171 (168-448)	416 (335-2.225)	NaCl/nativa	0,0339*	0,0339*

[0103] Los niveles de proteína total (figura 8) se midieron en el lavado broncoalveolar para evaluar la integridad pulmonar. No se observó aumento en los niveles de proteína en los ratones tratados con $\Delta 6$ PLY en comparación con las muestras del lavado de individuos sanos. Las vías respiratorias de los ratones tratados con PLY nativa tenían grandes cantidades de proteína (3,57 mg/ml) en su interior en comparación con un nivel de proteína total basal de 0,23 mg/ml para el grupo de control con solución salina (figura 8).

Ejemplo 8

Estudios de inmunogenicidad en ratones

[0104] Se realizó un estudio de inmunogenicidad en ratones para comparar las respuestas de la proteína PLY nativa con las proteínas mutantes $\Delta 5$, 6 y 7. Todas las composiciones inmunogénicas se prepararon a 5 μg de PLYr/dosis en presencia de una combinación de adyuvantes, AIPO₄ (0,2 mg) y MPL-SE (50 μg). Se usaron AIPO₄ (0,2 mg) y MPL-SE (50 μg) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control negativo.

Se inmunizó por vía intraperitoneal a grupos de 5 ratones CD-1 hembras de 6-8 semanas de vida y recibieron 2 dosis de estimulación a intervalos de 2 semanas. Se extrajo sangre por vía retroorbital en las semanas 0, 2, 4 y 6. El suero individual se evaluó y las medias geométricas del valor de anticuerpos (GMT, por sus siglas en inglés) representaban un punto final a 0,3. En la semana 0, los niveles de anticuerpos eran todos < 50 . Como se muestra en la tabla 4, los tres mutantes de PLY indujeron anticuerpos en los ratones que eran comparables a los inducidos por la PLY nativa.

Tabla 4: Respuestas de anticuerpos IgG en suero a la neumolisina recombinante mutante (PLYr) en ratones

Inmunógeno	Dosis de PLr (μg)	GMT de anticuerpos para la PLr Semana		
		2	4	6
PBS	-	50	50	50
PLr (nIPLr 01-01)	5,0	16.456	806.776	3.104.055

PLr nativa (PLY C73)	5,0	11.420	578.645	997.727
PLr Δ5	5,0	3.892	424.253	1.375.535
PLr Δ6	5,0	18.679	999.574	1.452.972
PLr Δ7	5,0	15.920	2.266.935	1.246.988

Ejemplo 9

Generación de anticuerpos anti-PLY

5

[0105] Los niveles de anticuerpos anti-PLY formados en los ratones inmunizados con PLY nativa o Δ6 PLY se determinaron mediante la inmunización de los ratones MF-1 con una inyección subcutánea inicial con 20 µg de PLY nativa o Δ6 PLY, cada uno con 100 µg de Alum/ 100 µl de dosis. A continuación, los ratones se estimularon dos veces con la misma dosis. El suero se recogió el día 47 del protocolo de inmunización y se analizó la presencia de anticuerpos IgG anti-PLY. Las curvas de dilución del anticuerpo se muestran en la figura 9 como la media de D.O.₄₉₀ nm ± DT del grupo frente a la dilución seriada del suero. Se usó una dilución inicial de suero a 1/1.000 como las muestras más concentradas que resultó en la saturación completa del sustrato. En la figura 9 se muestra que se produjeron niveles elevados de anticuerpos en respuesta tanto a Δ6 PLY + Alum como a PLY nativa + Alum, pero no en el grupo control sólo con Alum.

15

[0106] A continuación, se ensayó la capacidad de los anticuerpos anti-PLY para neutralizar la actividad hemolítica. Se observó que los anticuerpos anti-PLY en los grupos tratados con Δ6 PLY y PLY nativa neutralizaban por completo 2,5 unidades hemolíticas (UH) de PLY a un valor de 1.000-2.400 en un ensayo hemolítico (donde la capacidad de neutralización se expresa como el recíproco de la dilución del anticuerpo que neutralizan por completo 2,5 UH de PLY) (datos no mostrados). Esto demuestra que se reconoce un sitio neutralizante en PLY al que se unen los anticuerpos producidos en respuesta a la inmunización con Δ6 PLY + Alum y PLY nativa + Alum. Debido a que Δ6 PLY no es tóxica y no induce los niveles *in vivo* de producción de citoquinas observados con el tratamiento con la PLY nativa, Δ6 PLY es, por tanto, una proteína más favorable que la PLY nativa para su uso como una proteína vehículo inmunogénica.

25

Ejemplo 10

Efecto de la delección de un único aminoácido

[0107] Se generó un mutante PLY que tenía una delección de un único aminoácido: se eliminó el aminoácido alanina de la posición 146 (ΔA146 PLY). Como se muestra en la figura 10, esta delección única (ΔA146) también producía una forma no hemolítica de PLY. ΔA146 PLY no era hemolítica sobre SRBC a concentraciones >100 µg/ml, mientras que la PLY nativa era hemolítica a concentraciones <1 µg/ml. La producción de este mutante se confirmó mediante secuenciación e inmunotransferencia de la proteína expresada con suero policlonal anti-PLY (datos no mostrados).

35

Ejemplo 11

Actividad hemolítica de los mutantes de PLY en comparación con PLY W433F

40

[0108] La actividad hemolítica de los mutantes de delección Δ6, Δ7, Δ8 PLY y ΔA146 PLY frente a eritrocitos humanos se comparó con la que la PLY nativa y el mutante PLY portador de la sustitución W433F, que como se había descrito previamente posee sólo el 1% de la actividad hemolítica de la PLY nativa (véase el documento WO90/06951).

45

[0109] En la figura 11 se muestra que, según lo esperado, el mutante W433F mostraba ~1% de la actividad hemolítica de la PLY nativa. Sin embargo, los mutantes de delección no producen en absoluto lisis de los eritrocitos humanos.

Ejemplo 12

Unión de PLY etiquetado con GFP a las membranas de eritrocitos

[0110] Se utilizó la microscopia de fluorescencia para visualizar los eritrocitos tratados con formas etiquetadas con eGFP de PLY nativa y Δ6 PLY.

55

[0111] Se prepararon fantasmas de eritrocitos a partir de sangre humana repitiendo el lavado con agua destilada. Los fantasmas de eritrocitos generados a partir de 0,1 ml de sangre humana se incubaron con 50 µg de EGFP-PLY o 50 µg de Δ6EGFP-PLY en 1ml de PBS 1 x durante 30 min a 37°C. Las membranas fantasmas se sedimentaron, se lavaron tres veces en PBS y se visualizaron mediante microscopia de fluorescencia usando un

60

Axioscop 20 de Zeiss.

[0112] Los resultados (no mostrados) muestran que la unión de $\Delta 6$ PLY a las membranas es sustancialmente la misma que la de la PLY nativa.

5

Ejemplo 13

Análisis de la formación de poros mediante microscópica electrónica de transmisión

10 **[0113]** La microscopia electrónica se realizó como se describe anteriormente (ejemplo 4) para las membranas de eritrocitos de caballo con tinción negativa tratadas con neumolisina nativa a 0,2 mg/ml, PLY W433F a 0,2 mg/ml y $\Delta A146$ PLY a 0,2 mg/ml.

15 **[0114]** Se observaron poros en las membranas tratadas con PLY nativa y W433F pero no en las membranas tratadas con $\Delta A146$ PLY. En su lugar, el tratamiento con $\Delta A146$ PLY dio lugar a la formación de cadenas largas, que se piensa contenían toxina autoasociada que no era capaz de formar oligómeros para formar poros (datos no mostrados).

20 **[0115]** Por tanto, $\Delta 6$ PLY retiene las propiedades de unión a la membrana de la PLY nativa pero no forma poros en las membranas celulares.

Ejemplo 14

Citotoxicidad de los mutantes de neumolisina frente a fibroblastos murinos L929

25

[0116] La citotoxicidad de la PLY nativa, PLY W433F y los mutantes de delección $\Delta 6$, $\Delta 7$, $\Delta 8$ PLY y $\Delta A146$ PLY frente a los fibroblastos murinos L929 se determinó como se describe en el ejemplo 6. Los eritrocitos humanos se compararon con los de la PLY nativa y

30 **[0117]** Se encontró que el mutante W433F PLY era citotóxico a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y superior, mientras que los mutantes de delección no eran tóxicos en este ensayo (figura 12).

Ejemplo 15

Citotoxicidad del mutante de neumolisina $\Delta A146$ PLY sobre los mastocitos RBL-2H3

[0118] La citotoxicidad de $\Delta A146$ PLY frente a los mastocitos de rata RBL-2H3 se evaluaron usando un ensayo de desgranulación.

40 **[0119]** El ensayo se realizó como se describe en Stassen y col. (2003) usando 10^4 células/pocillo, incubadas con PLY nativa o $\Delta A146$ PLY durante 90 minutos.

45 **[0120]** Se determinó la liberación de β -hexosaminidasa a partir de gránulos de mastocitos, lo que proporciona una medida directa de la desgranulación de las células en respuesta a la toxina. $\Delta A146$ PLY no producía la desgranulación de los mastocitos (figura 13).

Ejemplo 16

Análisis de la temperatura corporal interna murina tras el tratamiento con PLY nativa o $\Delta A146$ PLY

50

[0121] Los ratones Balb/c fueron implantados con un chip de telemetría que permite la adquisición de la temperatura corporal interna (T_c). Los ratones fueron tratados con 1 μg de PLY nativa, 1 μg de $\Delta A146$ PLY o solo solución salina.

55 **[0122]** Como se muestra en la figura 14, el tratamiento con la PLY nativa producía una respuesta hipotérmica intensa con una caída de la T_c hasta 28°C . Esta T_c se mantuvo durante 6 horas tras lo cual se produjo un aumento de la T_c de $\sim 0,6^\circ\text{C/hora}$ y a las 24 horas, esta era similar a la T_c del grupo control, a pesar de lo cual seguía siendo estadísticamente significativa. El tratamiento con $\Delta A146$ PLY no producía hipotermia y la mediana de T_c era comparable a la del grupo control de solución salina.

60

[0123] Por tanto, el tratamiento de los ratones con PLY nativa producía una respuesta hipotérmica mantenida que no se observó durante el seguimiento del tratamiento con la misma cantidad de $\Delta A146$ PLY.

65 **[0124]** Mientras que la invención se ha descrito junto con los ejemplos de realizaciones descritos anteriormente, muchas modificaciones y variaciones equivalentes serán aparentes para los expertos en la técnica

cuando reciban esta descripción. Por consiguiente, los ejemplos de realizaciones de la invención establecidas se consideran ilustrativas y no limitantes.

Bibliografía:

- 5
[0125]
- Alexander, J.E., Lock, R.A., Peeters, C.C.A.M., Poolman, J.T., Andrew, P.W., Mitchell, T.J., Hansman, D. y Paton, J.C. (1994) Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least
 10 nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 62:5686-5688
- Aslam y Dent (1998), "Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences," Macmillan Reference Ltd., Londres, Inglaterra
- 15 Berry, A.M., Alexander, J.E., Mitchell, T.M., Andrew, P.W., Hansman, D. y Paton, J.C. (1995) Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 63:1969-1974
- Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J. y Sziegoleit, A. (1985) Mechanism of membrane damage by Streptolysin O. *Infect. Immun.* 47:52-60
 20
- Blum, M.D., Dagan, R., Mendelman, P.M., Pinsk, V., Giordani, M., Li, Shu, Bohidar, N. y McNeely, T.B. (2000) A comparison of multiple regimens of pneumococcal polysaccharide-meningococcal outer membrane protein complex conjugate vaccine and pneumococcal polysaccharide vaccine in toddlers. *Vaccine* 18:2359-2367
- 25 Bonev B., Gilbert, R. y Watts, A. (2000) Structural investigations of pneumolysin/lipid complexes. *Molecular Membrane Biology* 17:229-235
- Cockeran, R., Anderson, R. y Feldman, C. (2002) The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Current Opinion in Infectious Diseases* 15:235-239
 30
- Hausdorff, W.P., Bryant, J., Paradiso, P.R. y Siber, G.R. (2000) Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation & use, part I. *Clinical Infect. Dis.* 30:100-121
- Hotze, E.M., Heuck, A.P., Czajkowsky, D.M., Shao, Z., Johnson A.E. y Tweten, R.K. (2002) Monomer - monomer
 35 interactions drive the prepore to pore conversion of a β -barrel-forming cholesterol-dependent cytolysin. *J. Biol. Chem.* 277:11597 – 11605
- Hugo, F., Reichwein, J., Arvand, M., Krämer, S. y Bhakdi, S. (1986) Use of monoclonal antibody to determine the mode of transmembrane pore formation by streptolysin O. *Infect. Immun.* 54:641-645
 40
- Kadioglu, A., Gingles, N.A., Grattan, K., Kerr, A., Mitchell, T.J. y Andrew, P.W. (2000) Host cellular immune response to Pneumococcal lung infection in mice. *Infect. Immun.* 68:492-501
- Kalin, M (1998) Pneumococcal serotypes & their clinical relevance. *Thorax* 53:159-162
 45
- Katcocin, D.M. (2000) Characterisation of multivalent pneumococcal conjugate vaccines. *Dev. Biol. (Basel)* 103:113-119
- Kerr, A. R., Irvine, J.J., Search, J.J., Gingles, N.A., Kadioglu, A., Andrew P.W., McPheat, W.L., Booth, C.G. y Mitchell
 50 T.J. (2002) Role of inflammatory mediators in resistance and susceptibility to pneumococcal infection. *Infect. Immun.* 70:1547-1557
- Klein, D. (1995) Pneumococcal conjugate vaccines: review and update. *Microbial Drug Resist.* 1:49-58
- 55 Kyaw, M.H., Clarke, S., Jones, I.G. y Campbell, H. (2002) Non-invasive pneumococcal disease and antimicrobial resistance: vaccine implications. *Epidemiol. Infect.* 128:21-27
- Kyaw, M.H., Clarke, S., Edwards, G.F.S., Jones, I.G. y Campbell, H. (2000) Serotypes/groups distribution and antimicrobial resistance of invasive pneumococcal isolates. *Epidemiol. Infect.* 125(3):561-572
 60
- Mitchell, T.J., Andrew, Boulnois, G.J., Lee, C.J., Lock, R.A. y Paton, J.C. (1992) Molecular studies of pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae* as an aid to vaccine design. *Bacterial protein toxins* 23:429-438
- 65 Mitchell, T.J., Walker, J.A., Saunders, F.K., Andrew P.W. y Boulnois, G.J. (1989) Expression of the pneumolysin

- gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties. *Biochimica et Biophysica Acta* 1007:67-72
- Morgan, P.J., Varley, P.G., Rowe, A.J., Andrew, P.W. y Mitchell, T.J. (1993) Characterisation of the solution properties and conformation of pneumolysin, the membrane damaging toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem. J.* 296:671-674
- Morgan, P.J., Harrison, G., Freestone, P.P.E., Crane, D., Rowe, A.J., Mitchell, T.J., Andrew, P.W. y Gilbert, R.J.C. (1997) Structural and functional characterisation of two proteolytic fragments of the bacterial toxin, pneumolysin. *FEBS letters* 412:563-567
- Obaro, S.K. (2001) Confronting the pneumococcus: a target shift or bullet change? *Vaccine* 19:1211-1217
- Palmer, M. (2001) The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* 39:1681-1689
- Paton, J.C. (1996) The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Trends in Microbiology* 4(3):103-106
- Paton, J.C., Andrew, P.W., Boulnois, G.J. y Mitchell, T.J. (1993) Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:89-115
- Paton, J.C., Lock, R.A., Lee, C.J., Li, J.P., Berry, A.M., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Hansman, D. y Boulnois, G.J. (1991) Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. *Infect. Immun.* 59: 2297-2304
- Rayner, C.F.J., Jackson, A.D., Rutman, A., Dewar, A., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Cole, P.J. y Wilson, R. (1995) Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect. Immun.* 63:442-447
- Rijneveld, A.W., van den Dobbelsteen, G.P., Florquin, S., Standiford, T.J., Speelman, P., van Alphen, L. y van der Poll, T. (2002) Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice. *Journal of Infectious Diseases.* 185:123-126
- Rubins, J.B. y Janoff, E.N. (1998) Pneumolysin: A multifunctional pneumococcal virulence factor. *J. La. Clin. Med.* 131:21-27
- Salo, S., Närvänen, A. y Leinonen, M. (1993) Mapping of immunoreactive sites of pneumococcal pneumolysin by use of synthetic peptides. *Infect. Immun.* 61:2822-2826
- Saunders, F.K., Mitchell, T.J., Walker, J.A., Andrew, P.W. y Boulnois, G.J. (1989) Pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for in vitro activity. *Infect. Immun.* 57:2547-2552
- Search, J.J. (2002) The role of pneumolysin in proinflammatory mediator production. PhD Thesis, University of Glasgow
- Shepard, L.A., Heuck, A.P., Hamman, B.D., Rossjohn, J., Parker M.W., Ryan, K.R., Johnson, R.E. y Tweten, R.W. (1998) Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated pore-forming toxin *Clostridium perfringens* Perfringolysin O: An α -helical to β -Sheet transition identified by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 37:14563-14574
- Stassen, M., Müller, C., Richter, C., Neudörfel, C., Hültner, L., Bhakdi, S., Walev, I. y Schmitt, E. (2003) The Streptococcal Exotoxin Streptolysin O Activates Mast Cells To Produce Tumor Necrosis Factor Alpha by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase- and Protein Kinase C-Dependent Pathways. *Infect Immun.* 71(11):6171-6177.
- Suárez-Álvarez, B., del Mar García Suárez, M., Méndez, F.J. y de los Toyos, J.R. (2003). Characterisation of mouse monoclonal antibodies for pneumolysin: fine epitope mapping and V gene usage. *Immun. Letters* 00:1-13
- de los Toyos, J.R., Méndez, F.J., Aparicio, J.F., Vázquez, F., del Mar García Suárez, M., Fleites, A., Hardisson, C., Morgan P.J., Andrew P.W. y Mitchell T.J. (1996). Functional analysis of pneumolysin by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* 64:480-484
- Walker J.A., Allen, R.L., Falmange, P., Johnson, M.K. y Boulnois, G.J. (1987) Molecular cloning, characterisation, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 55:1184-1189
- Whitney C.G., Farley M.M., Hadler J., Harrison L.H., Bennett N.M., Lynfield R., Reingold A., Cieslak P.R., Pilishvili T.,

Jackson D., Facklam R.R., Jorgensen J.H. y Schuchat A. (2003) Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. N. Eng. J. Med. 348:1737-1746

REIVINDICACIONES

1. Una proteína neumolisina (PLY) mutante aislada,
5 en la que la proteína PLY mutante tiene al menos el 80% de identidad de secuencia con la proteína PLY nativa que tiene la secuencia mostrada en la figura 1 y difiere de dicha proteína PLY nativa en la presencia de una delección de uno o más aminoácidos dentro de la región de aminoácidos 144 a 151 de la secuencia nativa, de modo que la toxicidad del mutante se reduce en relación con la proteína nativa.
- 10 2. La proteína de la reivindicación 1, en la que se elimina la alanina 146.
3. La proteína de la reivindicación 1, en la que la proteína PLY mutante difiere de la proteína nativa en la delección de dos aminoácidos adyacentes dentro de la región de aminoácidos 144 a 151 de la secuencia nativa.
- 15 4. La proteína de la reivindicación 3, en la que se eliminan los aminoácidos valina 144 y prolina 145.
5. La proteína de la reivindicación 3, en la que se eliminan los aminoácidos alanina 146 y arginina 147.
6. La proteína de la reivindicación 3, en la que se eliminan los aminoácidos metionina 148 y glutamina
20 149.
7. La proteína de la reivindicación 3, en la que se eliminan los aminoácidos tirosina 150 y ácido glutámico 151.
- 25 8. La proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la proteína además comprende al menos una sustitución o delección de aminoácido al menos en una de las regiones de aminoácidos 257-297, 367-397 o 424-437 de la secuencia nativa.
9. Un conjugado inmunogénico que comprende:
30 a) un sacárido, oligosacárido, polisacárido, péptido, polipéptido o proteína y
b) una proteína neumolisina (PLY) mutante aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 35 10. El conjugado inmunogénico de la reivindicación 9, en el que el sacárido, oligosacárido o polisacárido deriva de *Streptococcus pneumoniae*.
11. Una secuencia de ácido nucleico aislada y purificada que comprende una secuencia de ácido nucleico
a) que codifica una proteína neumolisina (PLY) mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o b) que
40 es complementaria a la secuencia de ácido nucleico definida en a).
12. Un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico aislada y purificada que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 11.
- 45 13. Una célula huésped recombinante que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 12.
14. Un procedimiento de producción de una proteína neumolisina (PLY) mutante aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende: a) transformar, transfectar o infectar una célula huésped
50 con un vector de expresión recombinante como se describe en la reivindicación 12 y cultivar la célula huésped en condiciones que permitan la expresión de dicha proteína PLY mutante por la célula huésped y b) recuperar la proteína PLY mutante a partir del cultivo.
15. Una composición inmunogénica que comprende: a) una proteína neumolisina (PLY) mutante aislada
55 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y b) uno o más adyuvantes, diluyentes o vehículos fisiológicamente aceptables.
16. Una composición inmunogénica que comprende:
60 a) un conjugado inmunogénico según la reivindicación 9 o la reivindicación 10 y
b) uno o más adyuvantes, diluyentes o vehículos fisiológicamente aceptables.
17. Uso de una proteína PLY mutante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un conjugado
65 inmunogénico según la reivindicación 9 o la reivindicación 10 en la preparación de una composición inmunogénica

para la profilaxis o tratamiento de la infección por una bacteria que tiene una citolisina dependiente de colesterol que presenta reactividad inmunológica cruzada con la neumolisina nativa.

18. Uso según la reivindicación 17 en la que dicha infección bacteriana es infección por *Streptococcus*, p. 5
ej., infección por *Streptococcus pneumoniae*.
19. Una proteína PLY mutante aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un conjugado inmunogénico según la reivindicación 9 o la reivindicación 10 para su uso en un procedimiento de tratamiento médico.
- 10 20. Una proteína PLY mutante aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un conjugado inmunogénico según la reivindicación 9 o la reivindicación 10 para su uso en un procedimiento de profilaxis o tratamiento de la infección por una bacteria que tiene una citolisina dependiente de colesterol que presenta reactividad cruzada inmunológica con la neumolisina nativa.
- 15 21. Una proteína PLY mutante aislada o conjugado inmunogénico para su uso según la reivindicación 20 en la que dicha infección bacteriana es una infección por *Streptococcus*, p. ej., infección por *Streptococcus pneumoniae*.
- 20 22. Un procedimiento de preparación de una composición inmunogénica, comprendiendo el procedimiento los pasos de:
- proporcionar una proteína PLY mutante aislada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y conjugar la proteína mutante con un sacárido, oligosacárido, polisacárido, péptido, polipéptido o proteína.
- 25 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en la que la proteína mutante se conjuga con un polisacárido de *Streptococcus pneumoniae*.

Neumolisina de *Streptococcus pneumoniae*

Longitud:471 AA g.i. 47403 (X52474)

```
1  MANKAVNDFI LAMNYDKKKL LTHQGESIEN RFIKEGNQLP DEFVVIKRRK
51  RSLSTNTSDI SVTATNDSRL YPGALLVUDE TLENNPTLL AVDRAPMTYS
101 IDLPGLASSD SFLQVEDPSN SSVRGAVNDL LAKWHQDYGQ VNNVPARMOY
151 EKITAHSMEQ LKVKFGSDFE KTGNSLDIDF NSVHSGEKQI QIVNFKQIYY
201 TVSVDAVKNP GDVFQDTVTV EDLKQRGISA ERPLVYISSV AYGRQVYLKL
251 ETTSKSDEVE AAFEALIKGV KVAPQTEWKQ ILDNTEVKAV ILGGDPSSGA
301 RVVTGKVDMV EDLIQEGSRF TADHPGLPIS YTTSEFLRDNV VATFQNSTDY
351 VETKVTAYRN GDLLLDHSGA YVAQYYITWN ELSYDHQGKE VLTPKAWDRN
401 GQDLTAHFTT SIPLKGNVRN LSVKIRECTG LAWEWRTVY EKTDLPLVRK
451 RTISIWGTTL YPQVEDKVEN D
```

Figura 1

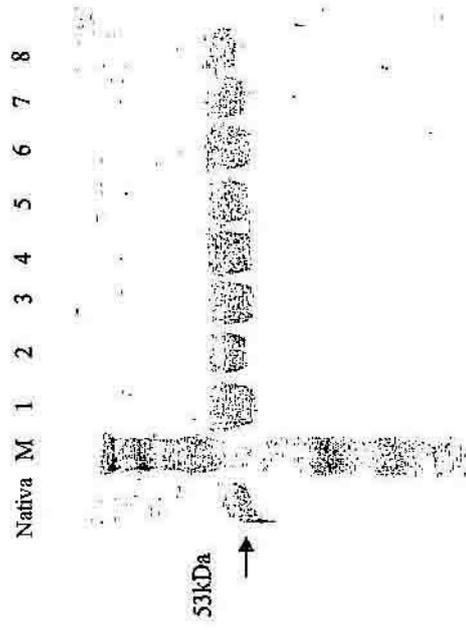


Figura 2

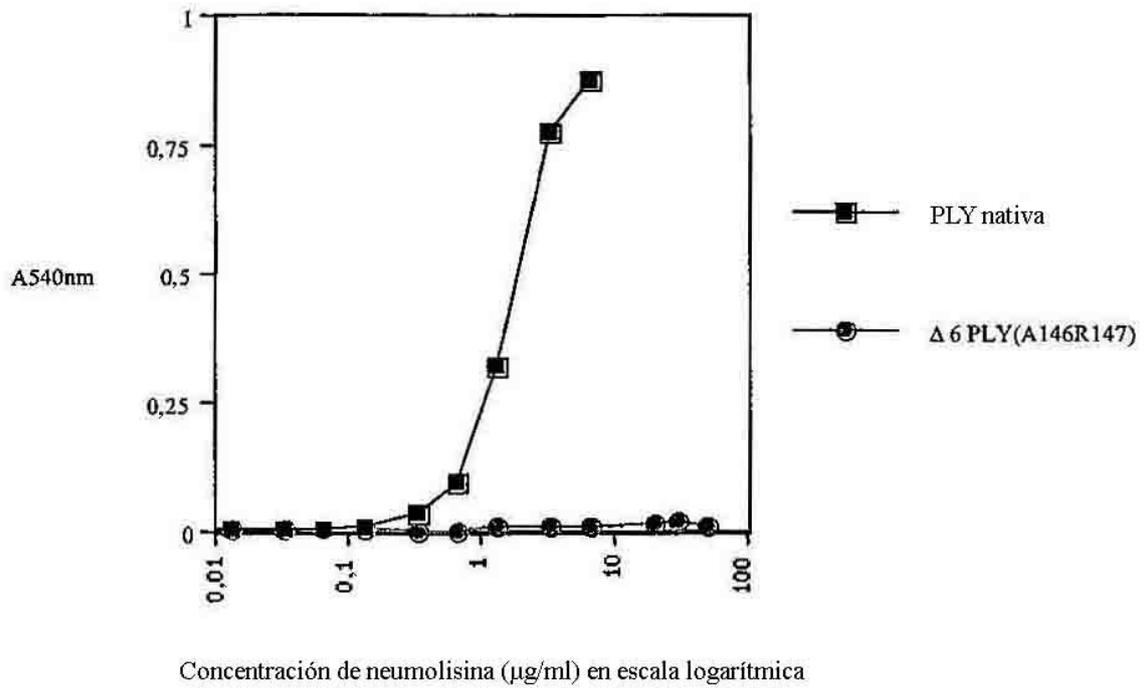


Figura 3

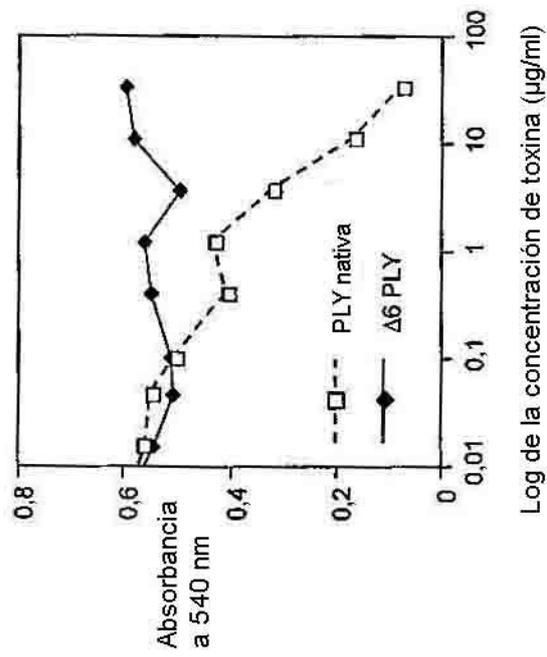


Figura 4

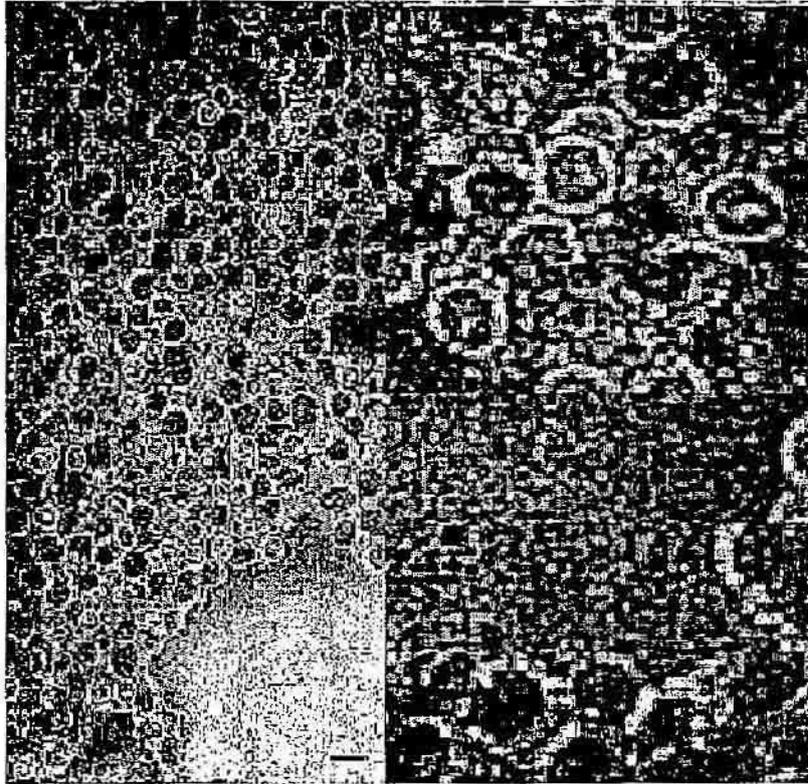


Figura 5

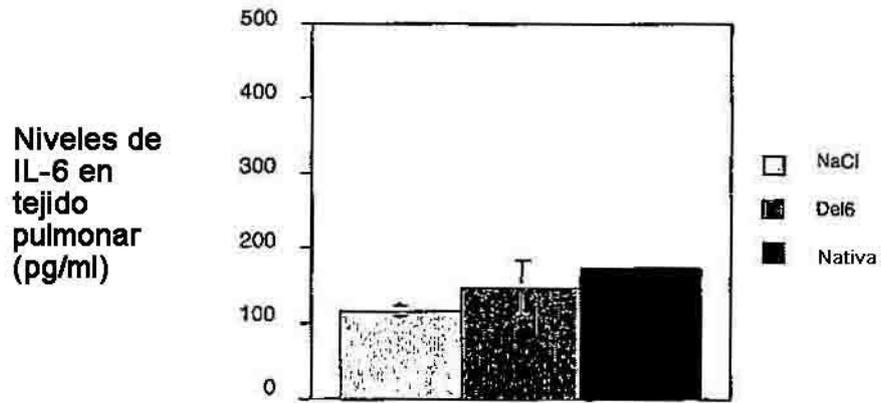


Figura 6

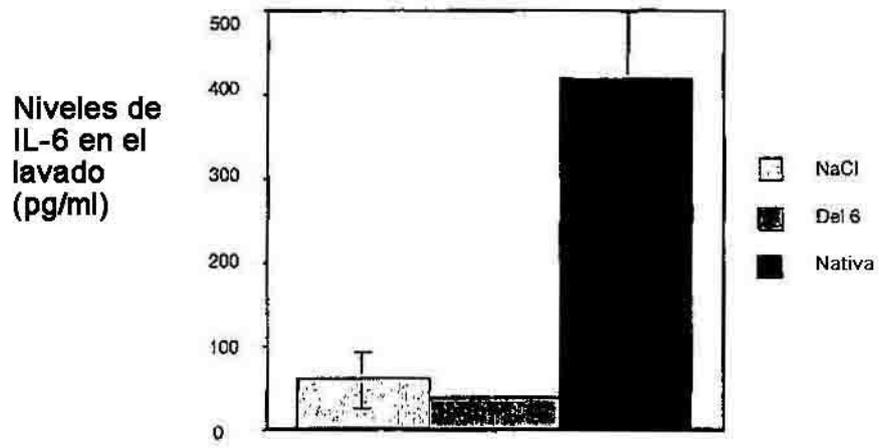


Figura 7

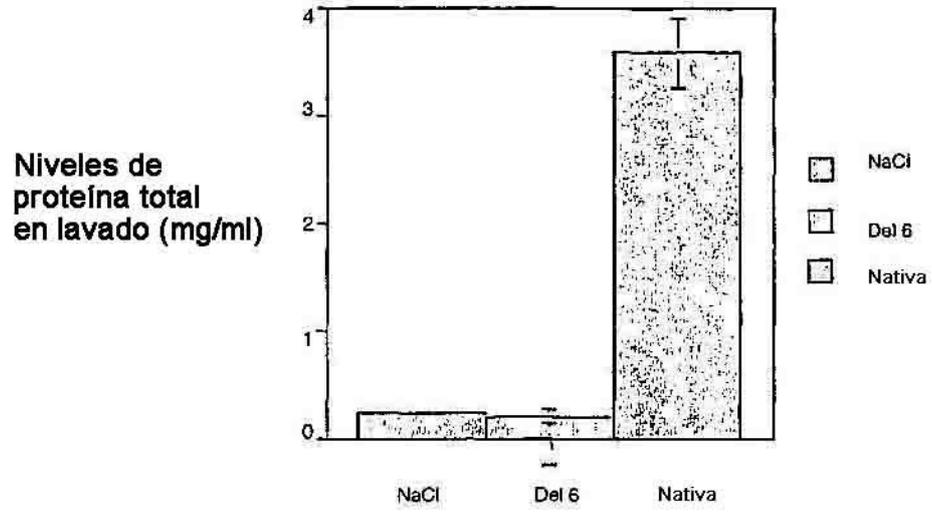


Figura 8

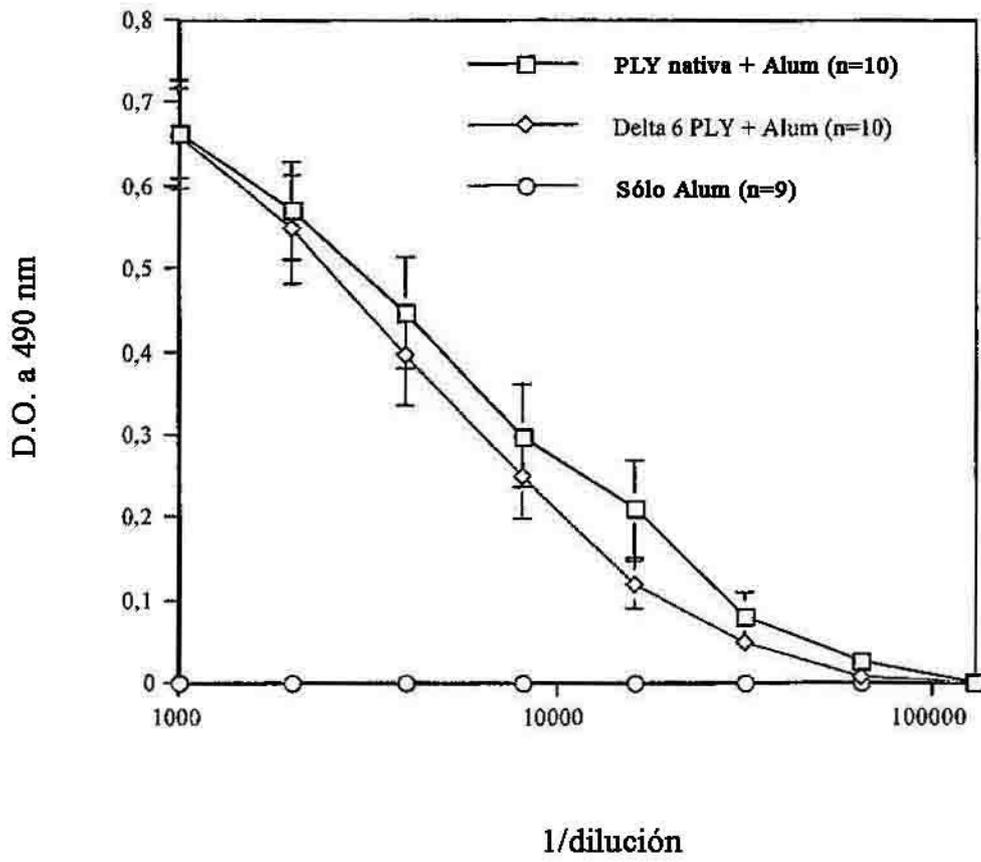


Figura 9

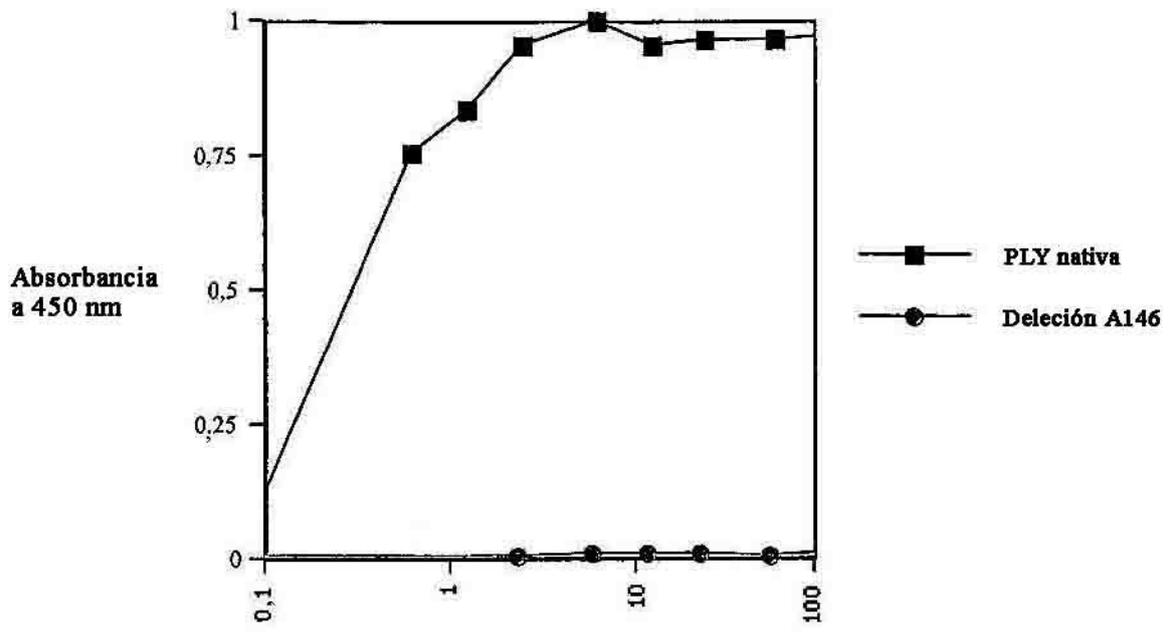


Figura 10

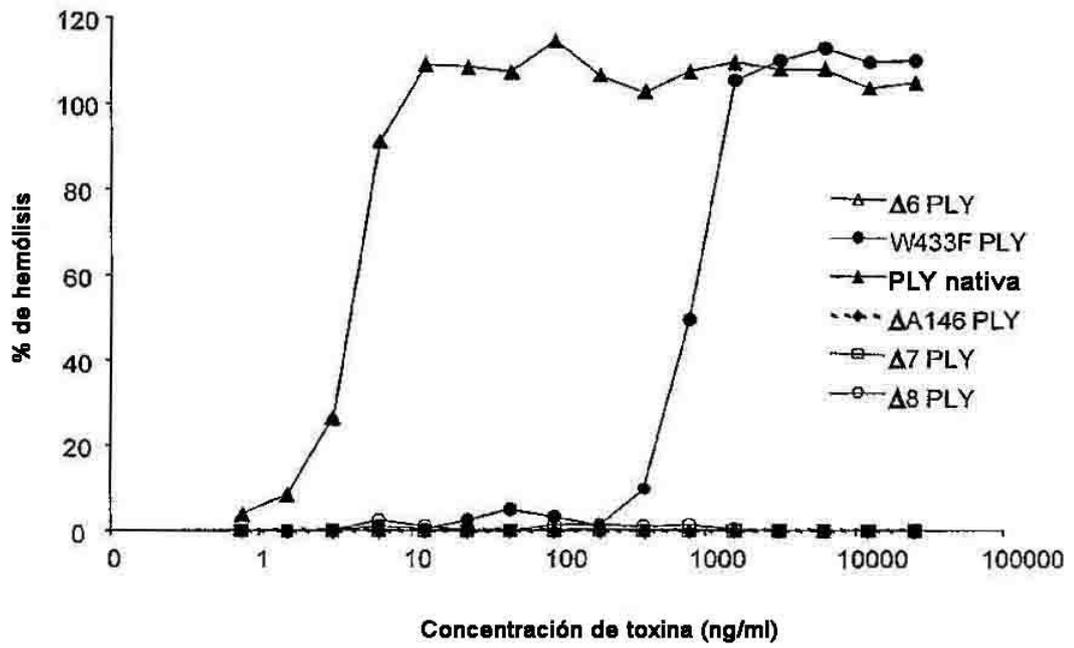


Figura 11

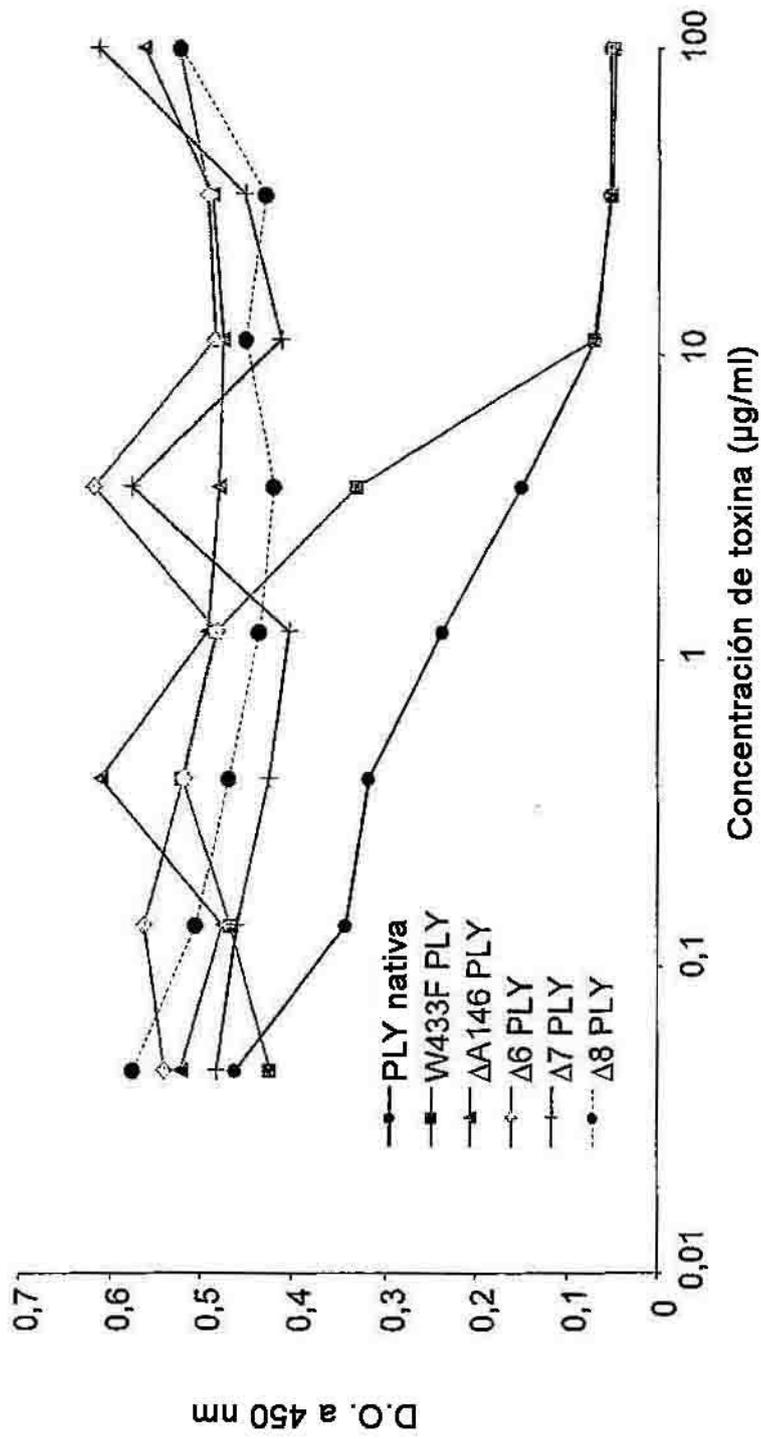


Figura 12

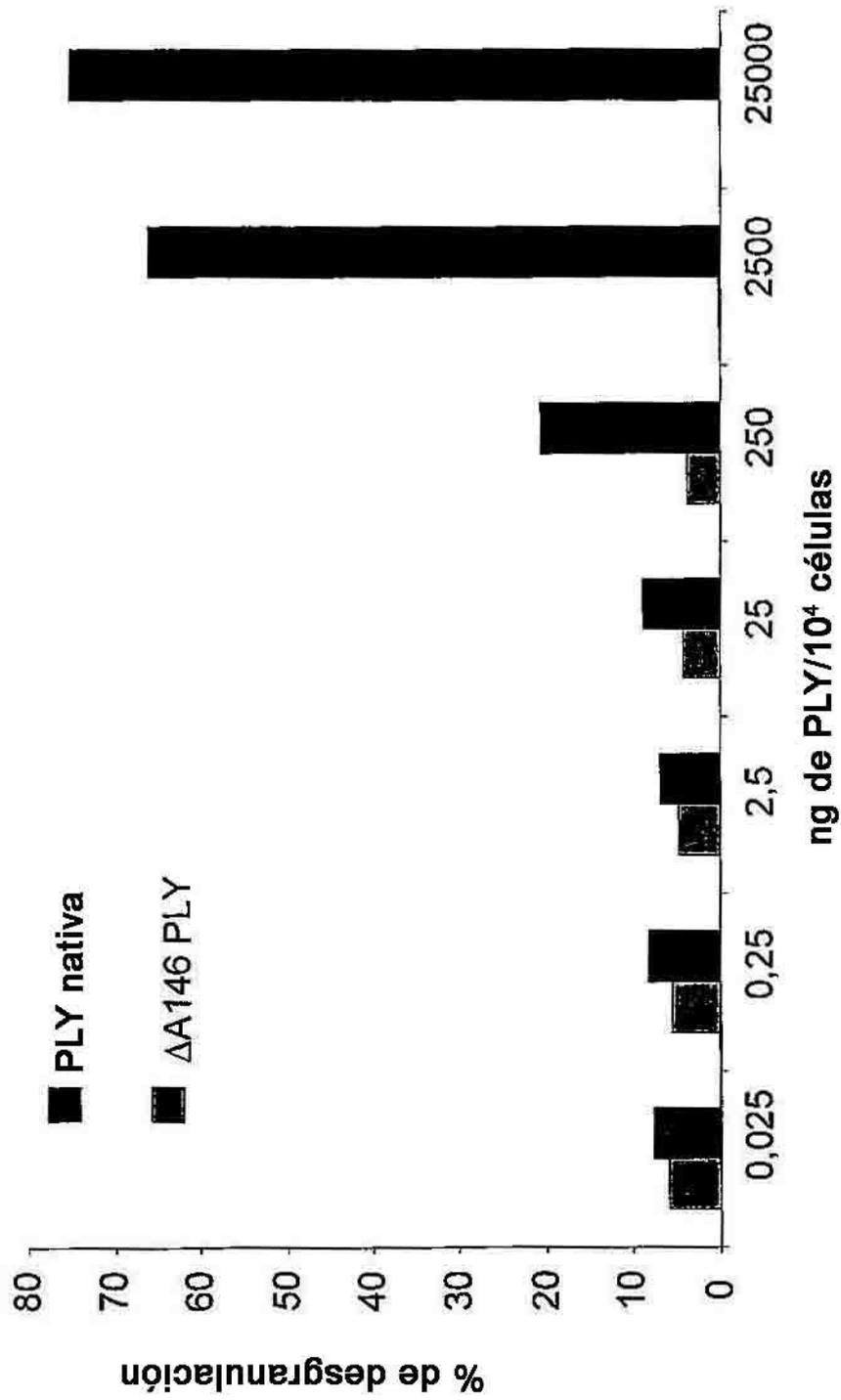


Figura 13

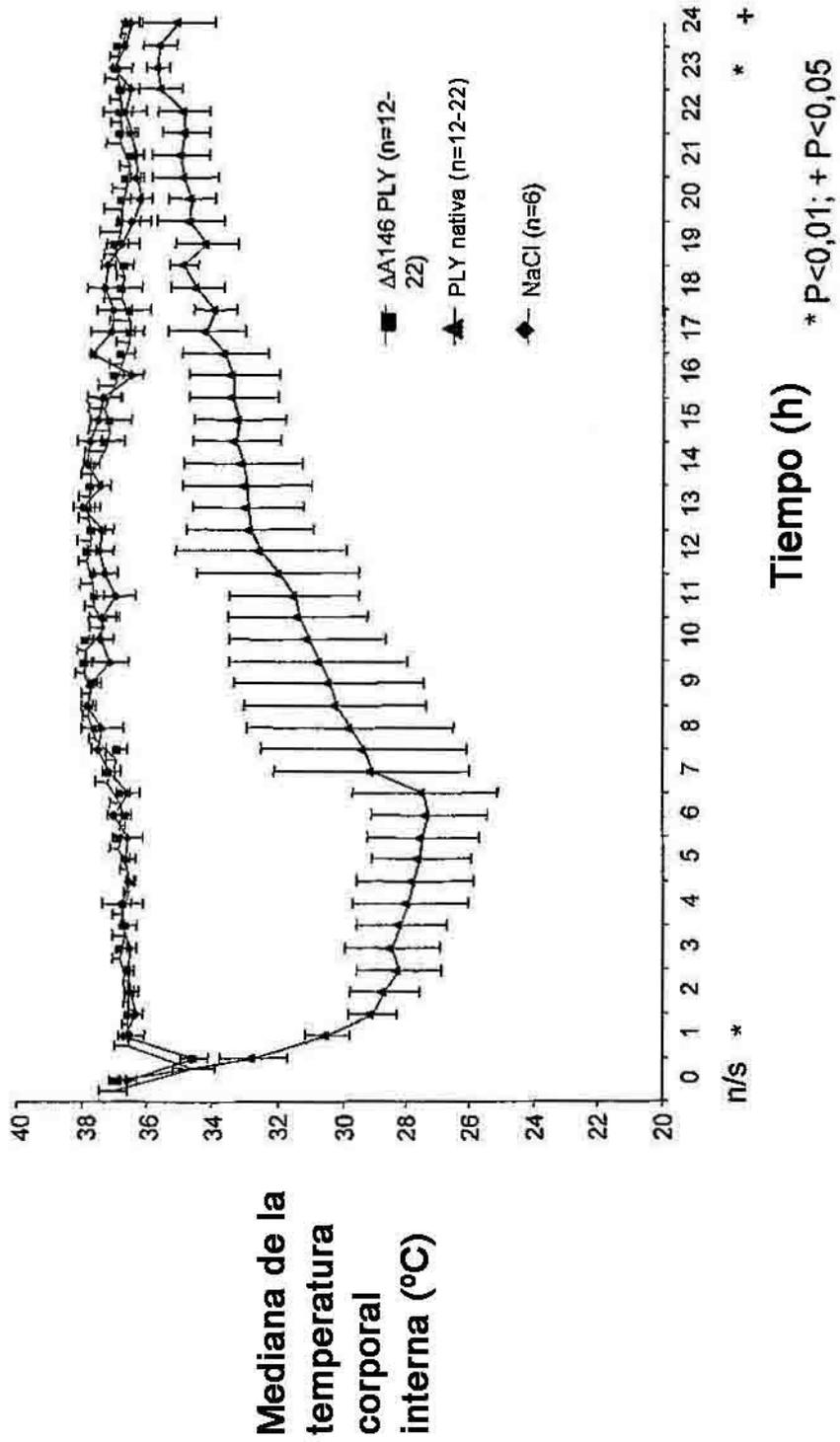


Figura 14