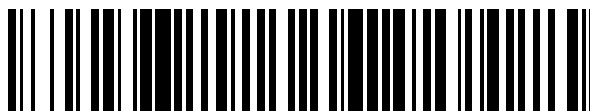


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 315**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/315** (2006.01)

**A61K 39/09** (2006.01)

**C07K 16/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2005 E 05782425 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 1931700**

54 Título: **Epítomos funcionales del antígeno PsaA de Streptococcus pneumoniae y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**19.05.2005 US 682495 P**

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

**26.11.2013**

73 Titular/es:

**THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF THE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (100.0%) CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION Technology Transfer Office 4770 Buford Hwy (K79) Atlanta, Georgia 30341, US**

72 Inventor/es:

**ADES, EDWIN W.;  
SAMPSON, JACQUELYN S.;  
STEINER, SANDRA;  
CARLONE, GEORGE M.;  
CABA, JOSEPH J. y  
RAJAM, GOWRISANKAR**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 431 315 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

Epítopos funcionales del antígeno PsaA de *Streptococcus pneumoniae* y usos de los mismos.

## 5 Antecedentes

**[0001]** *Streptococcus pneumoniae* es una causa principal de morbilidad y mortalidad global, provocando 1,5 millones de muertes cada año en todo el mundo, por ejemplo, de neumonía, bacteremia, meningitis, y otitis media principalmente en niños de <5 años de edad.

10

**[0002]** Están disponibles vacunas satisfactorias de polisacárido en los Estados Unidos. Sin embargo, países con recursos limitados no pueden producir estas vacunas. Las vacunas actuales (polisacárido 23-valente (adultos); y polisacárido 7-valente (niños)) protegen contra los serotipos más prevalentes. Existen 90 serotipos conocidos de *Streptococcus pneumoniae*. Sin embargo, existe la necesidad de una vacuna que proteja contra todos los serotipos conocidos. La adhesina A de superficie de neumococos (PsaA) es una proteína común de estreptococos, y es una vacuna candidata que podría producirse para todos los países.

15

## Descripción resumida

**[0003]** Se proporciona un péptido P4, que contiene un epítipo de la proteína PsaA de *Streptococcus pneumoniae*, y métodos y composiciones relacionados.

20

## Breve descripción de las figuras

25 **[0004]**

La Figura 1 muestra la adherencia media de 0,9 mg/ml, 0,53 mg/ml, 5,3 µg/ml, y 0,53 µg/ml de perlas recubiertas con rPsaA a células Detroit 562 (media de UF ± ET) cuando se añadían  $1.640 \pm 210$  perlas por pocillo.

30

La Figura 2 muestra la adherencia del lote de 0,53 mg/ml de perlas PsaA, perlas recubiertas con P4, y perlas de control recubiertas con glicina cuando se añadían  $1640 \pm 210$  perlas por pocillo.

La Figura 3 muestra la adherencia de fluoesferas recubiertas con rPsaA a células nasofaríngeas Detroit 562. Panel A. Fluoesferas recubiertas con rPsaA (Molecular Probes, 1 µm de diámetro) adherentes después de 5 lavados por pocillo. Panel B. Inhibición de la adherencia de fluoesferas recubiertas con rPsaA mediante la adición de suero humano (suero 7074, dilución 1:10) que contenía anticuerpos anti-PsaA (18,3 µg/ml, no diluido). Aumento de campo 400x. Las imágenes se capturaron usando un microscopio fluorescente invertido Leitz y una cámara digital. El diámetro de la fluoesfera es de 1 µm.

35

La Figura 4 muestra la identificación de la secuencia de aminoácidos del péptido 4 (P4) mediante la comparación de las secuencias de los péptidos P1, P2, y P3 con la región PsaA en cuestión.

40

La Figura 5 muestra la adherencia media de fluoesferas recubiertas con P1, P2, P3, P4, y rPsaA a células Detroit 562 (media de UF ± ET) cuando se añadían  $3.100 \pm 500$  fluoesferas por pocillo. Las fluoesferas de control se recubrieron con glicina para bloquear cualquier grupo carboxilo reactivo.

45

La Figura 6 muestra la adherencia a células nasofaríngeas Detroit 562 de fluoesferas recubiertas con diversas concentraciones de rPsaA (900, 530, 5,3 y 0,53 µg/ml). La señal de adherencia se da como la media de las UF ± ET cuando se añadían  $1.640 \pm 210$  fluoesferas por pocillo. La adherencia de las fluoesferas rPsaA recubiertas con 1 mg/ml de rPsaA se muestra en la Fig. 2A.

50

La Figura 7 muestra la inhibición competitiva de la adherencia de fluoesferas recubiertas con rPsaA mediante la adición de péptido (10 µg/pocillo,  $3$  a  $5 \times 10^{-2}$  mM) P1, P2, P3, P4, o 3 µg/pocillo ( $9 \times 10^{-4}$  mM) de proteína rPsaA. Concentraciones adicionales de rPsaA [intervalo = 0,125 a 10,0 µg/pocillo ( $0,4$  a  $29,7 \times 10^{-4}$  mM)] no produjeron ninguna reducción adicional de la adherencia de las fluoesferas recubiertas con rPsaA. Aunque no se muestra, se observó una reducción del 95,9% de la adherencia de las fluoesferas recubiertas con rPsaA cuando se usaban 20 µg/pocillo ( $6,2 \times 10^{-2}$  mM) de péptido homólogo P4 en la reacción de inhibición. La media (barras) y la SD (bigotes) representan el porcentaje promedio de la reducción obtenida en 3 ensayos diferentes usando múltiples concentraciones de fluoesferas PsaA (225 a 7.200 fluoesferas por pocillo) con señales que varían entre 5.500 y 100.000 UF para inhibiciones heterólogas del péptido y entre 5.500 y 23.000 UF para inhibición homólogas de PsaA.

55

60

La Figura 8 muestra el efecto de la adsorción parcial de anticuerpos contra PsaA en suero 7051 en la inhibición de la adherencia de fluoesferas recubiertas con rPsaA.

65

### Descripción detallada

**[0005]** Como se usa en la memoria y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a  
5 "un vehículo farmacéutico" incluye mezclas de dos o más de dichos vehículos, y similares.

### Péptidos/polipéptidos/proteínas

**[0006]** Se proporciona un péptido P4, que contiene un epítipo de la proteína PsaA de *Streptococcus pneumoniae*.  
10 Se proporciona un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID N° 1 (LFVSSVKKRRPMKTVSQDTNIPIYAQIF), un ejemplo del péptido P4.

**[0007]** También se proporciona un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos definida como LFVDSSVDDRPMKTVSQDTNIPIYAQIF (SEC ID N° 2). Este péptido es un ejemplo más de un péptido P4, y difiere  
15 de la SEC ID N° 1 en que el D en el resto 4 es E en P4, y los dos aminoácidos subrayados (DD en las posiciones 8 y 9) son "KR" en la secuencia P4. Se describe que un péptido P4 puede tener una, dos o las tres sustituciones de aminoácido mostradas en la SEC ID N° 2.

**[0008]** La expresión "péptido" o "parte peptídica" se usa ampliamente en la presente memoria para indicar dos o  
20 más aminoácidos unidos por un enlace peptídico. La expresión "fragmento" o "fragmento proteolítico" se usa en la presente memoria para hacer referencia a un producto que puede producirse mediante una reacción proteolítica sobre un polipéptido, es decir, un péptido producido tras la escisión de un enlace peptídico en los polipéptidos. Aunque la expresión "fragmento proteolítico" se usa generalmente en la presente memoria para hacer referencia a un péptido que puede producirse mediante una reacción proteolítica, debe reconocerse que el fragmento no tiene  
25 que producirse necesariamente mediante una reacción proteolítica, sino que también puede producirse usando métodos de síntesis química o métodos de tecnología de ADN recombinante, para producir un péptido sintético que es equivalente a un fragmento proteolítico. Debe reconocerse que el término "péptido" no se usa en la presente memoria para sugerir un tamaño particular o cantidad de aminoácidos que comprende la molécula, y que un péptido de la invención puede contener hasta varios restos aminoacídicos o más.  
30

**[0009]** Por "polipéptido aislado" o "polipéptido purificado" se entiende un polipéptido (o un fragmento del mismo) que está sustancialmente libre de los materiales con que el polipéptido está normalmente asociado en la naturaleza. Los polipéptidos de la invención, o fragmentos de los mismos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante extracción de una fuente natural (por ejemplo, una célula bacteriana), mediante expresión de un ácido nucleico recombinante  
35 que codifique el polipéptido (por ejemplo, en una célula o en un sistema de traducción sin células), o mediante síntesis química del polipéptido. Además, los fragmentos polipeptídicos pueden obtenerse por cualquiera de estos métodos, o escindiendo la proteína PsaA de longitud completa seguido de la purificación del fragmento.

**[0010]** Un fragmento de una proteína o polipéptido de referencia incluye solamente aminoácidos contiguos de la  
40 proteína/polipéptido de referencia, y es al menos un aminoácido más corto que la secuencia de referencia.

**[0011]** También se proporcionan variantes de la SEC ID N° 1. Por ejemplo, el péptido de la SEC ID N° 2 es una variante del péptido de la SEC ID N° 1. También se describen variantes de la SEC ID N° 2.

**[0012]** El péptido puede comprender aminoácidos además de los expuestos en la SEC ID N° 1 y la SEC ID N° 2. Por ejemplo, los aminoácidos adicionales pueden corresponder a uno o más aminoácidos N-terminales y/o C-terminales contiguos de PsaA. En un ejemplo el péptido consiste en la SEC ID N° 1, más combinaciones de 0 a 6 aminoácidos en el extremo N-terminal y de 0 a 6 aminoácidos en el extremo C-terminal, en el cual los aminoácidos son aminoácidos contiguos que flanquean la SEC ID N° 1 en una PsaA nativa (también mencionada como "no mutante" o "de origen natural") (por ejemplo, la PsaA descrita en GenBank, NCBI, base de datos Blast disponible en [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi), con el número de acceso gi|7920462|gb|AAF70667.1). En la mayoría de los casos hay de 0 a 3 aminoácidos adicionales en cada extremo, en los cuales los aminoácidos son aminoácidos contiguos que flanquean la SEC ID N° 1 en una PsaA nativa (también mencionada como "no mutante" o "de origen natural") (por ejemplo, la PsaA descrita en GenBank n° de acceso gi|7920462|gb|AAF70667.1). Así, el péptido puede  
50 consistir en la SEC ID N° 6. La variante peptídica más larga de P4 retiene al menos una función de P4.  
55

**[0013]** Además, se contemplan otros derivados de los péptidos que también funcionan en los métodos y composiciones descritos. Las variantes y derivados proteicos son bien comprendidos por los expertos en la materia y pueden implicar modificaciones de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos típicamente pertenecen a una o más de tres clases: variantes de sustitución, inserción o delección. Las inserciones incluyen fusiones amino y/o carboxilo terminales así como inserciones intrasecuencia de uno solo o múltiples restos aminoacídicos. Las inserciones habitualmente serán inserciones más pequeñas que las de fusiones amino o carboxilo terminales, por ejemplo, del orden de uno a cuatro restos. Las delecciones se caracterizan por la retirada de uno o más restos aminoacídicos de la secuencia proteica. Típicamente, se delecionan no más de  
60 aproximadamente 2 a 6 restos en un sitio cualquiera dentro de la molécula proteica. Estas variantes habitualmente  
65

se preparan por mutagénesis específica de sitio de los nucleótidos del ADN que codifica la proteína, de manera que se produzca el ADN que codifica la variante, y que después de ello se exprese el ADN en cultivo celular recombinante. Son bien conocidas las técnicas para hacer mutaciones de sustitución en sitios predeterminados de un ADN que tiene una secuencia conocida, por ejemplo mutagénesis con el cebador M13 y mutagénesis por PCR.

- 5 Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de restos individuales, pero pueden suceder en varias localizaciones diferentes a la vez; las inserciones habitualmente serán del orden de aproximadamente de 1 a 10 restos aminoacídicos; y las deleciones variarán aproximadamente de 1 a 30 restos. Las deleciones o las inserciones preferentemente se hacen en pares adyacentes, es decir, una deleción de 2 restos o una inserción de 2 restos. Las sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas puede combinarse para llegar a una
- 10 construcción final. Las mutaciones no deben situar a la secuencia fuera de la pauta de lectura y preferentemente no crearán regiones complementarias que podrían producir una estructura secundaria de ARNm. Las variantes de sustitución son aquellas en que al menos un resto se ha retirado y se ha insertado un resto diferente en su lugar. Dichas sustituciones generalmente se hacen de acuerdo con las siguientes Tablas 1 y 2 y se mencionan como sustituciones conservativas.

15

**TABLA 1 Abreviaturas de aminoácidos**

Aminoácido	Abreviaturas
alanina	Ala; A
aloisoleucina	Alle
arginina	Arg; R
asparagina	Asn; N
ácido aspártico	Asp; D
cisteína	Cys; C
ácido glutámico	Glu; E
glutamina	Gln; K
glicina	Gly; G
histidina	His; H
isoleucina	Ile; I
leucina	Leu; L
lisina	Lys; K
fenilalanina	Phe; F
prolina	Pro; P
ácido piroglutámico	Glu
serina	Ser; S
treonina	Thr; T
tirosina	Tyr; Y
triptófano	Trp; W
valina	Val; V

**TABLA 2: Sustituciones de aminoácidos**

Resto original	Sustituciones ejemplares
Arg	Lys, Gln
Asn	Gln
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Gln
Ile	leu; val
Leu	ile; val
Lys	arg; gln
Met	leu; ile
Phe	met; leu; tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	trp; phe
Val	ile; leu

**[0014]** Se hacen cambios sustanciales en la función o la identidad inmunológica seleccionando sustituciones que sean menos conservativas que las de la Tabla 2, es decir, seleccionando restos que difieren de forma más significativa en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de tronco del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una lámina o en conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que, en general, se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades de la proteína serán aquellas en que (a) un resto hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, está sustituido en el lugar de (o por) un resto hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina está sustituida en el lugar de (o por) cualquier otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo, o histidilo, está sustituido en el lugar de (o por) un resto electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, está sustituido en el lugar de (o por) uno que no tiene cadena lateral, por ejemplo, glicina, en este caso, (e) se aumenta la cantidad de sitios de sulfatación y/o glucosilación.

**[0015]** Por ejemplo, el remplazo de un resto aminoacídico con otro que es biológica y/o químicamente similar es conocido por los expertos en la materia como sustitución conservativa. Por ejemplo, una sustitución conservativa sería remplazar un resto hidrófobo por otro, o un resto polar por otro. Dichas variaciones sustituidas de forma conservativa de cada secuencia descrita explícitamente se incluyen dentro de los polipéptidos mosaico proporcionados en la presente memoria.

**[0016]** Una sustitución conservativa es una sustitución de un resto aminoacídico por otro resto aminoacídico que tiene propiedades bioquímicas similares. En un ejemplo particular, una sustitución conservativa es una sustitución de aminoácido en un péptido que no afecta sustancialmente a la función biológica del péptido. Un péptido puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo 1-10 sustituciones conservativas, 2-5 sustituciones conservativas, 4-9 sustituciones conservativas, tal como 2, 5 ó 10 sustituciones conservativas. Más específicamente, un péptido de al menos 20 aminoácidos puede tener 1-2 sustituciones conservativas, un péptido de al menos aproximadamente 25 aminoácidos puede tener 1-3 sustituciones conservativas, y un péptido de al menos aproximadamente 35 aminoácidos puede tener 1-4 sustituciones conservativas. En otras palabras, hasta aproximadamente un 10% de los aminoácidos en un péptido puede estar sustituido de forma conservativa.

**[0017]** Por ejemplo, una variante que tiene una sustitución conservativa en el péptido P4 (tal como un péptido que tiene la secuencia proporcionada en las SEC ID N° 7-15) no afecta sustancialmente a la capacidad del péptido P4 para 1) unirse o adherirse al receptor de PsaA, 2) generar un anticuerpo específico para PsaA cuando se usa como inmunógeno, 3) inhibir o bloquear la unión o adhesión de PsaA a su receptor, 4) inducir la activación de células eucariotas provocando la reducción de a) citoquinas tales como IL-8, IL-6, EGF o b) la alteración de la membrana de la superficie celular o los cambios nucleares, o un aumento en las citoquinas tales como FGFbásico o 6) aumentar la actividad fagocítica contra *S. pneumoniae*. Los cambios nucleares pueden incluir hacerse más granulares y fragmentarse. El citoplasma sufre vacuolización y obtiene proyecciones de pseudopodios detectados por MET (microscopía electrónica de transmisión). La invasión o internalización de las bacterias se demostró por la supervivencia a tratamiento con gentamicina (45%) después de realizar los ensayos de adherencia.

**[0018]** Como se usa en la presente memoria, la expresión "específica" en el contexto de la unión de un anticuerpo se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia del péptido P4 y PsaA de *S. pneumoniae* en una población heterogénea de proteínas, proteoglicanos, y otras moléculas biológicas. Así, en condiciones determinadas, los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la presente invención se unen a un epítopo definido por el péptido P4 o un mimético o variante específico de P4 y no se unen en cantidades significativas a otras proteínas o proteoglicanos presentes en el sujeto.

**[0019]** En la presente memoria, "inhibición" o "inhibe" significa reducir la actividad especificada, por ejemplo, la unión. Así, se entiende que inhibición puede indicar desde una ligera reducción en la unión hasta el bloqueo completo de la unión. Un "inhibidor" puede ser cualquier cosa que reduzca la actividad indicada.

**[0020]** Puede producirse un polipéptido que contenga una o más sustituciones conservativas manipulando la secuencia de nucleótidos que codifica ese polipéptido usando, por ejemplo, procedimientos convencionales tales como mutagénesis dirigida al sitio o PCR. Alternativamente, puede producirse un polipéptido que contenga una o más sustituciones conservativas usando métodos convencionales de síntesis peptídica. Puede usarse un barrido con alanina para identificar los restos aminoacídicos en una proteína que pueden tolerar una sustitución de aminoácido. En un ejemplo, la actividad biológica de la proteína no se disminuye en más de un 25%, por ejemplo no más de un 20%, por ejemplo no más de un 10%, cuando se sustituye con alanina, u otro aminoácido conservativo (tal como los enumerados a continuación), uno o más aminoácidos nativos.

**[0021]** Ejemplos de aminoácidos que pueden sustituir un aminoácido original en una proteína y que se consideran sustituciones conservativas incluyen, aunque sin limitación: Ser o Gly para Ala; Lys para Arg; Gln o His para Asn; Glu para Asp; Ser para Cys; Asn para Gln; Asp para Glu; Pro para Gly; Asn o Gln para His; Leu o Val para Ile; Ile o Val para Leu; Arg o Gln para Lys; Leu o Ile para Met; Met; Leu o Tyr para Phe; Thr para Ser; Ser para Thr; Tyr para Trp; Trp o Phe para Tyr; y Ile o Leu para Val.

**[0022]** Se proporcionan ejemplos de péptidos P4 funcionales con sustituciones respecto a la SEC ID N° 1 en las SEC ID N° 7-15.

**[0023]** Puede hallarse información adicional respecto a sustituciones conservativas en, entre otras localizaciones, Ben-Bassat et al., (J. Bacteriol. 169:751-7, 1987), O'Regan et al., (Gene 77:237-51, 1989), Sahin-Toth et al., (Protein Sci. 3:240-7, 1994), Hochuli et al., (Bio/Technology 6:1321-5, 1988) y en libros de texto convencionales de genética y biología molecular.

**[0024]** Se entiende que existen numerosos análogos de aminoácidos y péptidos que pueden incorporarse en las composiciones descritas. Por ejemplo, existen numerosos D aminoácidos o aminoácidos que tienen un sustituyente funcional diferente del de los aminoácidos mostrados en la Tabla 1 y la Tabla 2. Se describen los estereoisómeros opuestos de péptidos de origen natural, así como los estereoisómeros de análogos peptídicos. Estos aminoácidos pueden incorporarse fácilmente en las cadenas polipeptídicas cargando las moléculas de ARNt con el aminoácido de elección y diseñando por ingeniería construcciones genéticas que utilicen, por ejemplo, codones ámbar, para insertar el aminoácido análogo en una cadena peptídica de un modo específico de 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 y Hennecke, Bio/technology, 12:678-682 (1994) todos los cuales están incorporados en la presente memoria por referencia para el material relacionado con análogos de aminoácidos).

**[0025]** Pueden producirse moléculas que se parezcan a péptidos, pero que no se conectan mediante un enlace peptídico natural. Por ejemplo, los enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácidos pueden incluir  $\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$  (cis y trans),  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ , y  $-\text{CH}_2\text{SO}-$  (Éstos y otros pueden hallarse en Spatola, A. F. en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983); Spatola, A. F., Vega Data (Marzo 1983), Vol. 1, Punto 3, Peptide Backbone Modifications (revisión general); Morley, Trends Pharm Sci (1980) pág. 463-468; Hudson, D. et al., Int J Pept Prot Res 14:177-185 (1979) ( $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ); Spatola et al. Life Sci 38:1243-1249 (1986) ( $-\text{CH}_2-\text{S}-$ ); Hann J. Chem. Soc Perkin Trans. I 307-314 (1982) ( $-\text{CH}-\text{CH}-$ , cis y trans); Almquist et al. J. Med. Chem. 23:1392-1398 (1980) ( $-\text{COCH}_2-$ ); Jennings-White et al. Tetrahedron Lett 23:2533(1982) ( $-\text{COCH}_2-$ ); Szelke et al. solicitud europea, EP45665 CA (1982): 97:39405(1982) ( $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ); Holladay et al. Tetrahedron. Lett 24:4401-4404 (1983) ( $-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ); y Hruby Life Sci 31:189-199 (1982) ( $-\text{CH}_2-\text{S}-$ ). Un enlace no peptídico particularmente preferido es  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ . Se entiende que los análogos peptídicos puede tener más de un átomo entre los átomos del enlace, tales como b-alanina, ácido g-aminobutírico, y similares.

**[0026]** Los análogos de aminoácidos y los análogos y los análogos peptídicos a menudo tienen propiedades potenciadas o deseables tales como, producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas potenciadas (semivida, absorción, potencia, eficacia, etc.), especificidad alterada (por ejemplo, un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida, y otras. Véase la patente US 6.358.922 expedida el 19 de marzo de 2002 referida a aminoácidos no naturales cargados positivamente, métodos para prepararlos y usos de los mismos en péptidos.

**[0027]** Pueden usarse D-aminoácidos para generar péptidos más estables, ya que los D aminoácidos no se reconocen por las peptidasas y similares. Puede usarse la sustitución sistémica de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) para generar péptidos más estables. Pueden usarse restos de cisteína para ciclar o unir dos o más péptidos juntos. Esto puede ser beneficioso para limitar a los péptidos en conformaciones particulares. (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992).

**[0028]** Los péptidos descritos pueden mezclarse con, unirse a o adherirse a otros componentes para crear una estructura que contenga el péptido descrito (por ejemplo, P4 u otros epítopos similares). El péptido puede ser multivalente como en un péptido antigénico múltiple (véase la solicitud US 09/613.092 y Johnson et al. (The Journal of Infectious Diseases 2002; 185: 489-96), incorporado en la presente memoria por referencia para su contenido respecto al modo para preparar péptidos antigénicos múltiples.) El péptido también puede estar en una proteína de fusión que proporciona múltiples copias del péptido.

### Miméticos

**[0029]** Se proporcionan peptidomiméticos de P4 que tienen una estructura conformacional idéntica o similar a la confirmación de P4 (por ejemplo, SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2 para una referencia). Un mimético de P4 también retiene la función de unión al receptor de PsaA, y otras funciones descritas en la presente memoria, de la SEC ID N° 1. El mimético puede ser una macromolécula (por ejemplo, proteína, ácido nucleico, etc.) o puede ser una molécula pequeña.

**[0030]** La estructura 3-D (conformación) del péptido P4 está definida por su secuencia primaria, que a su vez controla su estructura secundaria y terciaria. Ejemplos de miméticos incluyen las SEC ID N° 7-15. Se describen

métodos para identificar miméticos adicionales en la presente memoria.

**[0031]** Hay modelos tridimensionales normalmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Hay programas informáticos disponibles que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de miméticos candidatos seleccionados. La inspección de estas presentaciones permite el análisis de la tarea probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia mimética candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad del mimético candidato de retener su conformación. De este modo, puede prepararse racionalmente miméticos con diferencias en la estructura primaria con una probabilidad razonable de retener la estructura 3-D. Además, otro enfoque es el uso de presentación en fagos para identificar moléculas que comparte la conformación (estructura 3-D) de P4. Ejemplos de miméticos incluyen los péptidos P1 (SEC ID N° 3) y P3 (SEC ID N° 5), que se identificaron por presentación en fagos. Así, aunque tienen diferentes estructuras primarias (secuencias de aminoácidos) comparten la conformación de, y, por tanto, las características funcionales del péptido P4.

**[0032]** También se proporciona un kit reactivo de antígeno/péptido que comprende recipientes del péptido P4, variante o mimético de la invención y uno o más reactivos para detectar la unión del antígeno/péptido a un anticuerpo contra PsaA de *S. pneumoniae* o el péptido P4. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, marcas fluorescentes, marcas enzimáticas, u otras marcas. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para reacciones enzimáticas, en las cuales las reacciones enzimáticas producen un producto que puede visualizarse.

### Anticuerpos

**[0033]** Se proporciona un anticuerpo que se une específicamente al epítipo definido por los péptidos descritos. Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse específicamente a un péptido que comprende la secuencia expuesta en la SEC ID N° 1 y que tiene la conformación definida por el péptido que consiste en la SEC ID N° 1. Este péptido aislado representa la conformación de un epítipo inmunodominante de la PsaA nativa. Se describe un anticuerpo que se une específicamente a un péptido que comprende la secuencia expuesta en la SEC ID N° 2 y que tiene la conformación definida por el péptido que consiste en la SEC ID N° 2. Este péptido aislado representa la conformación de un epítipo inmunodominante de la PsaA nativa. Un anticuerpo específico para P4 es específico para PsaA ya que P4 define un epítipo específico para PsaA.

**[0034]** Estos anticuerpos se crean por el medio habitual, incluyendo inmunización de un animal con un péptido de la invención, por ejemplo, inmunización con el péptido de la SEC ID N° 1. Asimismo, los péptidos de la SEC ID N° 3 (P1) y 5 (P3) también son inmunógenos para la preparación de un anticuerpo que se une al epítipo definido por el péptido de la SEC ID N° 1. La inmunogenicidad de P1, P2 y P3 se describe en Johnson et al. (2002). Un ejemplo de un anticuerpo que se une a la SEC ID N° 1 es el anticuerpo denominado 8G12G11B10, o un fragmento del mismo que retiene las características de unión del anticuerpo 8G12G11B10. Este anticuerpo monoclonal está depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas VA, 20110-2209, con el número de acceso PTA-6532.

**[0035]** Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" abarca, aunque sin limitación, inmunoglobulina completa (es decir, un anticuerpo intacto) de cualquier clase. Así, incluye moléculas intactas así como fragmentos de las mismas tales como, por ejemplo, Fab y F(ab')<sub>2</sub>, que son capaces de unirse al determinante epítipo. Los anticuerpos nativos son habitualmente glucoproteínas heterotetraméricas, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Típicamente, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque la cantidad de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V(H)) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V(L)) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que restos aminoacídicos particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y pesada. Las cadenas ligeras de anticuerpos de cualquier especie vertebrada pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas humanas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden estar adicionalmente divididas en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3, e IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Un experto en la materia reconocería las clases comparables para ratón. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman alfa, delta, épsilon, gamma; y mu, respectivamente.

**[0036]** El término "variable" se usa en la presente memoria para describir ciertas partes de los dominios variables que difieren en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por

su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad habitualmente no está distribuida uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra típicamente en tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se llaman región  
 5 flanqueante (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β, conectados por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en cercana proximidad mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat E. A. et al., "Sequences of Proteins of  
 10 Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

**[0037]** La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo  
 15 obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto las posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. Los anticuerpos monoclonales en la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de una especie particular o que pertenecen a una clase o  
 20 subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos obtenidos de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad deseada (véase, la patente US 4.816.567 y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)).

**[0038]** Los anticuerpos monoclonales se preparan usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por  
 25 Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975) o Harlow y Lane. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988). En un método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para producir linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden  
 30 inmunizarse in vitro. En un ejemplo, el agente inmunizante comprende un péptido descrito en la presente memoria (por ejemplo, que comprende la SEC ID N° 1 Tradicionalmente, la generación de anticuerpos monoclonales ha dependido de la disponibilidad de proteína o péptidos purificados para su uso como inmunógeno. Más recientemente, las inmunizaciones basadas en ADN se han mostrado prometedoras como medio para provocar fuertes respuestas inmunes y generar anticuerpos monoclonales. En este enfoque; puede usarse inmunización  
 35 basada en ADN, en la cual se inyecta un ADN que codifica una parte de un péptido descrito (por ejemplo, que comprende la SEC ID N° 1 expresada como una proteína de fusión con IgG1 humana, en el animal hospedador de acuerdo con métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Kilpatrick KE, et al. Gene gun delivered DNA-based immunizations mediate rapid production of murine monoclonal antibodies to the Flt-3 receptor. Hybridoma. 1998 Dic;  
 17(6):569-76; Kilpatrick KE et al. High-affinity monoclonal antibodies to PED/PEA-15 generated using 5 micrograms  
 40 of DNA. Hybridoma. 2000 Ago; 19(4):297-302, que se incorporan en la presente memoria por referencia para los métodos de producción de anticuerpos).

**[0039]** Un enfoque alternativo a las inmunizaciones con proteína purificada o ADN es usar antígeno expresado en  
 45 baculovirus. Las ventajas de este sistema incluyen facilidad de generación, elevados niveles de expresión, y modificaciones post-traduccionales que son muy similares a las observadas en sistemas de mamífero. El uso de este sistema implica expresar los dominios del anticuerpo contra P4 como proteínas de fusión. El antígeno se produce insertando un fragmento génico en pauta entre la secuencia señal y el dominio de proteína madura de la secuencia de nucleótidos del anticuerpo contra P4. Esto provoca la presentación de las proteínas foráneas sobre la superficie del virión. Este método permite la inmunización con virus completo, eliminando la necesidad de  
 50 purificación de antígenos diana.

**[0040]** Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica ("PBL") en métodos para producir anticuerpos  
 monoclonales si se desean células de origen humano, o se usan esplenocitos o células de ganglio linfático si se desean fuentes de mamífero no humanas. Los linfocitos entonces se fusionan con una línea celular inmortalizada  
 55 usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice" Academic Press, (1986) pág. 59-103). Las líneas celulares inmortalizadas habitualmente son células de mamífero transformadas, incluyendo células de mieloma de roedor, de origen bovino, equino, y humano. Habitualmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más  
 60 sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), que son sustancias que evitan el crecimiento de células HGPRT-deficientes. Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan de forma eficaz, soportan un elevado nivel de expresión estable de anticuerpo por  
 65 parte de las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las



líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas murinas de mieloma, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif, y la American Type Culture Collection, Rockville, Md. También se han descrito líneas celulares humanas de mieloma y de ratón-humanas de heteromioma para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., 5 "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications" Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pág. 51-63). El medio de cultivo en que se cultivan las células de hibridoma después puede ensayarse para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un péptido descrito. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). 10 Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la técnica, y se describen adicionalmente en los siguientes Ejemplos o en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988).

**[0041]** Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse por dilución limitante o procedimientos de clasificación FACS y cultivarse por métodos convencionales. Los medios de cultivo 15 adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse in vivo en forma de fluido ascítico en un mamífero.

**[0042]** Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o el fluido ascítico mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, 20 por ejemplo, cromatografía en proteína A-Sepharose, proteína G, hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

**[0043]** Los anticuerpos monoclonales también pueden crearse por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente US 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales puede aislarse fácilmente y 25 secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede situarse en vectores de expresión, que después se introducen por transfección en células hospedadoras tales como células COS de simio; células de ovario de hámster chino (CHO), células de plasmacitoma, o células de mieloma que no 30 producen de otro modo proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente US 4.816.567), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de inmunoglobulina. Opcionalmente, dicho polipéptido no de 35 inmunoglobulina se sustituye en el lugar los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituye en el lugar de los dominios variables de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por P4 y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

**[0044]** Pueden emplearse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J(H)) en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal provoca una inhibición completa de la producción endógena de anticuerpo. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de la línea germinal 45 humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal provocará la producción de anticuerpos humanos tras exposición a antígeno (véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551-255 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993)). También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de presentación en fagos (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). También están disponibles las técnicas de Cote et al. y Boerner et al. para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer 50 Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boerner et al., J. Immunol., 147(1 ):86-95 (1991)).

**[0045]** Como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo o fragmentos del mismo" abarca anticuerpos quiméricos y anticuerpos híbridos, con especificidades duales o múltiples de antígeno o epítipo, y 55 fragmentos, tales como F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab y similares, que incluyen fragmentos híbridos. Así, se proporcionan fragmentos de los anticuerpos que retienen la capacidad de unirse a sus antígenos específicos. Por ejemplo, se incluyen fragmentos de anticuerpos que mantienen la actividad de unión a P4/PsaA dentro del significado de la expresión "anticuerpo o fragmento del mismo". Dichos anticuerpos y fragmentos pueden crearse por técnicas conocidas en la técnica y pueden seleccionarse para su especificidad y actividad de acuerdo con los métodos 60 expuestos en los Ejemplos y en métodos generales para producir anticuerpos y seleccionar anticuerpos para la especificidad y actividad (véase Harlow y Lane. Antibodies, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988)).

**[0046]** También se incluyen dentro del significado de "anticuerpo o fragmentos del mismo" conjugados de 65 fragmentos de anticuerpo y proteínas de unión a antígeno (anticuerpos de cadena sencilla) como se describe, por

ejemplo, en la patente US 4.704.692.

**[0047]** También se proporciona un parátipo o fragmento del anticuerpo inmunogénicamente específico aislado. Un epítipo inmunogénico específico del anticuerpo puede aislarse del anticuerpo completo por alteración química o mecánica de la molécula. Los fragmentos purificados así obtenidos se ensayan para determinar su inmunogenicidad y especificidad mediante los métodos mostrados en la presente memoria. Opcionalmente se sintetizan directamente parátipos inmunorreactivos del anticuerpo. Un fragmento inmunorreactivo se define como una secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente dos a cinco aminoácidos consecutivos derivados de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo.

10

**[0048]** Alternativamente, se ligan químicamente segmentos peptídicos no protegidos donde el enlace formado entre los segmentos peptídicos como resultado del ligamiento químico es un enlace no natural (no peptídico) (Scholzer, M et al. Science; 256:221 (1992). Esta técnica se ha usado para sintetizar análogos de dominios proteicos así como grandes cantidades de proteínas relativamente puras con actividad biológica completa (deLisle Milton RC et al., Techniques in Protein Chemistry IV. Academic Press, Nueva York, pág. 257-267 (1992)).

15

**[0049]** También se describen fragmentos de anticuerpos que tienen bioactividad. Los fragmentos polipeptídicos pueden ser proteínas recombinantes obtenidas por clonación de ácidos nucleicos que codifican los polipéptido en un sistema de expresión capaz de producir los fragmentos polipeptídicos de los mismos, tales como un sistema de expresión de adenovirus o baculovirus. Por ejemplo, se puede determinar el dominio activo de un anticuerpo a partir de un hibridoma específico que puede causar un efecto biológico asociado con la interacción del anticuerpo con P4 o PsaA. Por ejemplo, pueden deletionarse los aminoácidos encontrados que no contribuyen a la actividad o la especificidad o afinidad de unión del anticuerpo sin una pérdida en la actividad respectiva. Por ejemplo, en diversas realizaciones, se retiran secuencialmente aminoácidos amino o carboxi-terminales de la molécula nativa o modificada no de inmunoglobulina o de inmunoglobulina y se ensaya la actividad respectiva en uno de muchos ensayos disponibles. En otro ejemplo, un fragmento de un anticuerpo comprende un anticuerpo modificado en el cual se ha sustituido al menos un aminoácido en el lugar del aminoácido de origen natural en una posición específica, y se ha reemplazado una parte de los aminoácidos amino terminales o carboxi terminales, o incluso una región interna del anticuerpo, con un fragmento polipeptídico u otro resto, tal como biotina, que puede facilitar la purificación del anticuerpo modificado. Por ejemplo, puede fusionarse un anticuerpo modificado a una proteína de unión a maltosa, a través de química peptídica o clonación de los ácidos nucleicos respectivos que codifican los dos fragmentos polipeptídicos en un vector de expresión tal que la expresión de la región codificante produzca un polipéptido híbrido. El polipéptido híbrido puede purificarse por afinidad pasándolo sobre una columna de afinidad de amilosa, y el receptor de anticuerpo modificado puede entonces separarse de la región de unión a maltosa escindiendo el polipéptido híbrido con la proteasa específica factor Xa. (Véase, por ejemplo, New England Biolabs Product Catalog, 1996, pág. 164.). Están disponibles procedimientos de purificación similares para aislar proteínas híbridas también de células eucariotas.

20

25

30

35

40

45

50

**[0050]** Los fragmentos, unidos a otras secuencias o no, incluyen inserciones, deletiones, sustituciones, u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o restos aminoácidos específicos, con la condición de que la actividad del fragmento no esté alterada o dañada significativamente en comparación con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no modificado. Estas modificaciones pueden proporcionar alguna propiedad adicional, tal como retirar o añadir aminoácidos capaces de formar enlaces disulfuro, para aumentar su bio-longevidad, para alterar sus características secretoras, etc. En cualquier caso, el fragmento debe poseer una propiedad bioactiva, tal como actividad de unión, regulación de la unión en el dominio de unión, etc. Pueden identificarse regiones funcionales o activas del anticuerpo por mutagénesis de una región específica de la proteína, seguido de expresión y ensayo del polipéptido expresado. Dichos métodos son fácilmente evidentes para un experto en la materia y pueden incluir mutagénesis específica de sitio del ácido nucleico que codifica el antígeno. (Zoller MJ et al. Nucl. Acids Res. 10:6487-500 (1982)).

55

60

**[0051]** También pueden adaptarse técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla específicos para una proteína antigénica de la invención (véase, por ejemplo, la patente US 4.946.778). Además, pueden adaptarse métodos para la construcción de bibliotecas de expresión de F(ab) (véase, por ejemplo, Huse, et al., 1989 Science 246: 1275-1281) para permitir una identificación rápida y eficaz de fragmentos F(ab) monoclonales con la especificidad deseada por una proteína o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de la misma. Pueden producirse fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos para un antígeno proteico por técnicas conocidas en la técnica incluyendo, aunque sin limitación: (i) un fragmento F((ab'))(2) producido por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento Fab generado por reducción de los puentes disulfuro de un fragmento F((ab'))(2); (iii) un fragmento F(ab) generado por el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (iv) fragmentos F(v).

**[0052]** Los métodos para la producción de anticuerpos de cadena sencilla son bien conocidos para los expertos en la materia. Se remite al experto en la materia a la patente US 5.359.046 para dichos métodos. Un anticuerpo de cadena sencilla se crea fusionando juntos los dominios variables de las cadenas pesada y ligera usando un corto enlazador peptídico, de manera que se reconstituya un sitio de unión a antígeno en una única molécula. Se han

65

desarrollado fragmentos variables de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) en que el extremo C-terminal de un dominio variable está fijado al extremo N-terminal del otro dominio variable mediante un péptido o enlazador de 15 a 25 aminoácidos sin alterar significativamente la unión a antígeno o especificidad de la unión (Bedzyk et al., 1990; Chaudhary et al., 1990). Se elige el enlazador que permita que la cadena pesada y la cadena ligera se unan juntas en su orientación conformación apropiada. Véase, por ejemplo, Huston, J. S., et al., *Methods in Enzym.* 203:46-121 (1991). Estos Fv carecen de las regiones constantes (Fc) presentes en las cadenas pesada y ligera del anticuerpo nativo.

**[0053]** También son adecuados métodos *in vitro* para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, puede conseguirse usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica. Por ejemplo, la digestión puede realizarse usando papaína. Se describen ejemplos de digestión con papaína en el documento WO 94/29348 publicado el 22 de diciembre de 1994, la patente US 4.342.566, y Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988). La digestión con papaína de anticuerpos típicamente produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento, llamado fragmento F(ab')<sub>2</sub>, que tiene dos sitios de combinación de antígeno y aún es capaz de entrecruzarse con el antígeno.

**[0054]** Los fragmentos Fab producidos en la digestión del anticuerpo también contienen los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio de cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab' unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra. Fab'-SH es la denominación en la presente memoria para Fab' en que el resto o restos de cisteína de los dominios constantes albergan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

**[0055]** En anticuerpos híbridos, un par de cadena pesada y ligera es homólogo al encontrado en un anticuerpo surgido contra un elemento de reconocimiento de antígeno, por ejemplo, epítipo, mientras que el otro par de cadena pesada y ligera es homólogo a un par encontrado en un anticuerpo surgido contra otro epítipo. Esto provoca la propiedad de valencia multi-funcional, es decir, la capacidad de unirse a al menos dos epítopos diferentes de forma simultánea. Dichos híbridos pueden formarse por fusión de hibridomas que producen los anticuerpos componentes respectivos, o por técnicas recombinantes. Como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo híbrido" se refiere a un anticuerpo en el cual cada cadena es homóloga por separado con referencia a una cadena de anticuerpo de mamífero, pero la combinación representa un nuevo ensamblaje de modo que se reconocen dos antígenos diferentes por el anticuerpo.

**[0056]** Las técnicas de humanización de anticuerpos generalmente implican el uso de tecnología de ADN recombinante para manipular la secuencia de ADN que codifica una o más cadenas polipeptídicas de una molécula de anticuerpo. Por consiguiente, una forma humanizada de un anticuerpo no humano (o un fragmento del mismo) es un anticuerpo o cadena de anticuerpo quimérico (o un fragmento del mismo, tal como un Fv, Fab, Fab', u otra parte de unión a antígeno de un anticuerpo) que contiene una parte de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo no humano (donante) integrada en la región flanqueante de un anticuerpo humano (receptor).

**[0057]** Para generar un anticuerpo humanizado, se remplazan los restos de una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una molécula de anticuerpo receptor (humano) por restos de una o más CDR de una molécula de anticuerpo donante (no humano) que se sabe que tiene las características deseadas de unión a antígeno (por ejemplo, un cierto nivel de especificidad y afinidad por el antígeno diana). En algunos casos, los restos flanqueantes (FR) de Fv del anticuerpo humano se remplazan por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden contener restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o flanqueantes importadas. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoacídicos introducidos en el mismo procedentes de una fuente que es no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en que algunos restos de las CDR y posiblemente algunos restos de las FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedor. Los anticuerpos humanizados generalmente contienen al menos una parte de una región constante de anticuerpo (Fc), típicamente la de un anticuerpo humano (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988), y Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)).

**[0058]** Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos humanizados de acuerdo con los métodos de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988), Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR de roedor o las secuencias de CDR con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. También se describen métodos que pueden usarse para producir anticuerpos humanizados en la patente US 4.816.567 (Cabilly et al.), patente US 5.565.332 (Hoogenboom et al.), patente US 5.721.367 (Kay et al.), patente US 5.837.243 (Deo et al.), patente US 5.939.598 (Kucherlapati et al.), patente US 6.130.364 (Jakobovits

et al.), y patente US 6.180.377 (Morgan et al.).

**[0059]** También se proporciona un kit reactivo de anticuerpo que comprende recipientes del anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo de la invención y uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo o fragmento del mismo contra PsaA de *S. pneumoniae* o el péptido P4. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, marcas fluorescentes, marcas enzimáticas, u otras marcas. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para reacciones enzimáticas, en las cuales las reacciones enzimáticas producen un producto que puede visualizarse.

## 10 Vacunas

**[0060]** Se proporciona una vacuna que comprende el péptido de la SEC ID N° 1 y un vehículo farmacéutico. Se describe una vacuna que comprende un péptido de la SEC ID N° 2 y un vehículo farmacéutico para referencias.

15 **[0061]** Los péptidos inmunogénicos descritos en la presente memoria pueden usarse en la construcción de una vacuna que comprende una cantidad inmunogénica del antígeno y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La vacuna puede ser un péptido de la presente invención o el péptido unido a un vehículo o una mezcla de péptido unido o no unido. La vacuna entonces puede usarse en un método para prevenir infecciones por *S. pneumoniae*.

20 **[0062]** Las cantidades inmunogénicas del péptido pueden determinarse usando procedimientos convencionales. En resumen, se preparan diversas concentraciones de péptidos o polipéptidos putativos inmunorreactivos específicos, se administran a un animal y se determina la respuesta inmunológica (por ejemplo, la producción de anticuerpos o respuesta mediada por células) de un animal a cada concentración. La composición de vacuna también puede comprender un adyuvante.

25

## Composiciones farmacéuticas

**[0063]** Las composiciones descritas (por ejemplo, péptidos P4 y anticuerpos específicos para P4) también pueden administrarse *in vivo* en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

**[0064]** Las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen una cantidad eficaz del péptido P4, peptidomimético, anticuerpo contra P4 o receptor de PsaA. Las cantidades eficaces del péptido P4 descrito en las composiciones varían de 0,1 µg a 1,0 mg, por ejemplo de 2 µg a 500 µg o de 2,5 a 5 µg, medidas por kilogramo de peso corporal. Para anticuerpos, y la dosis eficaz incluye un título de ≥100 para sueros humanos con una inhibición de al menos el 50% de la adherencia de PsaA o una inhibición de al menos el 30% de la adherencia de neumococos medida en ensayos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, pueden administrarse dosificaciones de 0,02 mg/kg a 0,5 mg/kg o de 0,005 mg/kg a 0,025 mg/kg.

35

**[0065]** Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no indeseable biológicamente o de otro modo, es decir, el material puede administrarse a un sujeto, junto con el ácido nucleico o vector, sin causar ningún efecto biológico indeseable o sin interactuar de un modo perjudicial con ninguno de los otros componentes de la composición farmacéutica en que está contenido. Naturalmente se seleccionaría el vehículo que minimizara cualquier degradación del ingrediente activo y minimizara cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como sabrían bien los expertos en la materia.

45

**[0066]** Los vehículos farmacéuticos son conocidos para los expertos en la materia. Éstos muy típicamente serían vehículos convencionales para la administración de fármacos a seres humanos, incluyendo soluciones tales como agua estéril, solución salina, y soluciones tamponadas a pH fisiológico. Las composiciones pueden administrarse de acuerdo con procedimientos convencionales usados por los expertos en la materia como se describe adicionalmente en la presente memoria.

50

**[0067]** Se describen vehículos adecuados y sus formulaciones en Remington: The Science and practice of Pharmacy (19<sup>a</sup> ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995. Típicamente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica. Ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen, aunque sin limitación, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Vehículos adicionales incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semi-permeables de polímeros sólidos hidrófobos que contienen el anticuerpo, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Será evidente para los expertos en la materia que ciertos vehículos pueden ser más preferidos dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración y la concentración de la composición que se está administrando.

60

**[0068]** Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos y similares además de la molécula de elección. Las composiciones

farmacéuticas también pueden incluir uno o más ingredientes activos tales como agentes antimicrobianos, agentes anti-inflamatorios, anestésicos, y similares.

**[0069]** Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, solución de Ringer lactada, o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores de fluidos y nutrientes, reforzadores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, anti-oxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares.

**[0070]** Las formulaciones para administración tópica pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares. Estas formulaciones pueden incluir gomas de mascar, pastillas, geles orales o dentífricos.

**[0071]** Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, sobres, o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, auxiliares de dispersión o aglutinantes.

**[0072]** Algunas de las composiciones pueden administrarse potencialmente en forma de una sal de adición de ácidos o bases farmacéuticamente aceptable, formada por reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiociánico, ácido sulfúrico, y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, y ácido fumárico, o por reacción con una base inorgánica tal como hidróxido sódico, hidróxido de amonio, hidróxido potásico, y bases orgánicas tales como mono-, di-, trialkil- y arilaminas y etanolaminas sustituidas.

**[0073]** El vehículo farmacéuticamente aceptable en una composición de vacuna puede comprender solución salina u otros vehículos adecuados (Arnon, R. (Ed.) *Synthetic Vaccines* 1:83-92, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1987). Un adyuvante o mezcla de adyuvantes también puede ser parte del vehículo de la vacuna, en cuyo caso puede seleccionarse mediante criterios convencionales basados en el antígeno usado, el modo de administración y el sujeto (Arnon, R. (Ed.), 1987). Un "adyuvante" es una composición que potencia la actividad inmunogénica de una sustancia inmunogénica cuando se administra junto con esa sustancia. Los adyuvantes pueden incluir adyuvante TiterMax™, hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio como adyuvante. Ejemplos de adyuvantes que pueden usarse para administración intranasal incluyen los siguientes: 1) subunidad B de la toxina del cólera (CTB), 2) didesoxinucleótido de citosina fosfato guanosina CpG, 3) quitosana, 4) muramildipérido (MDP), 5) toxina de adenilato ciclasa invasora celular de *Bordetella pertussis*, y 6) PEG (polietilenglicol). Un experto en la materia sería capaz de identificar otros antígenos o inmunógenos, e inmunomoduladores, tales como citoquinas, apropiados para las presentes composiciones farmacéuticas. Los métodos de administración pueden ser por medio oral o sublingual, o por inyección, dependiendo de la vacuna particular usada y el sujeto al cual se administra.

#### 45 Receptor

**[0074]** El receptor para PsaA se describe en la presente memoria como el compañero de unión del péptido P4. Habiendo descrito P4 como el dominio de unión al receptor de PsaA, una conformación que define el receptor está esencialmente definida estructuralmente como la correspondencia 3-dimensional para P4. PsaA contacta con una célula mediante la unión o adhesión al receptor celular al que se une PsaA. El receptor celular puede ser estructuralmente complejo, comprendiendo un complejo de múltiples subunidades, no simplemente un componente único. El receptor puede caracterizarse como una molécula de adhesión intercelular como se sugería por el patrón de perlas PsaA que se unen a células NP (Figura 1). Un mecanismo similar a la unión de internalina (*Listeria monocytogenes*) a E-cadherina es un mecanismo potencial para la unión de PsaA/P4 a células NP.

**[0075]** Los miméticos del receptor de PsaA comparten la estructura conformacional esencial definida por el péptido P4, y son idénticos o similares al dominio nativo de unión a PsaA del receptor o receptores celulares de PsaA. El mimético puede ser un dominio de unión a PsaA del receptor nativo de PsaA, es decir, la región que interacciona con un péptido P4. Así, el mimético puede ser un fragmento de unión a P4 del receptor de PsaA. El receptor/mimético del receptor puede usarse para ensayos de diagnóstico o ensayos funcionales de anticuerpos producidos tras infección y/o vacunación.

**[0076]** El receptor puede ser una proteína nativa (de origen natural) presente en una célula sobre la cual existe de forma natural. El receptor o mimético del receptor puede expresarse de forma recombinante en cantidades seleccionadas en una célula que no lo expresa de forma natural o puede sobre-expresarse en una célula que

expresa de forma natural el receptor.

### Métodos para prevenir y tratar la infección

- 5 **[0077]** Puede usarse un péptido P4 como se describe en la presente memoria en un método que se proporciona para la unión de la proteína adhesina A de superficie de neumococos (PsaA) a células que expresan un receptor de PsaA, poniendo en contacto la célula con un péptido P4 descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el péptido P4 puede comprender o consistir en el péptido de la SEC ID N° 1 o variantes o análogos del mismo. El péptido P4 puede, alternativamente, comprender o consistir en el péptido de la SEC ID N° 3 o variantes o
- 10 análogos del mismo, o el péptido puede comprender o consistir en el péptido de la SEC ID N° 5 o variantes o análogos del mismo.
- [0078]** Las expresiones "unión" y "adhesión" se usan en la presente memoria para describir la interacción típica de un ligando con su receptor o una interacción anticuerpo-antígeno.
- 15 **[0079]** El uso descrito en un método para inhibir la unión es aplicable a cualquier célula diana que exprese un receptor de o mimético del receptor de PsaA, por ejemplo, neumocitos, células epiteliales o endoteliales. Las células diana para infección por *S. pneumoniae* pueden ser células de la mucosa o células de las vías respiratorias, entre otras. Una clase de células particularmente relevante es las células epiteliales nasofaríngeas, que son una reserva
- 20 natural para *S. pneumoniae*. Puede identificarse cualquier tipo celular que exprese el receptor de PsaA usando los protocolos de unión a P4 descritos en la presente memoria. Esto incluye el receptor de PsaA de origen natural y el receptor expresado por células transformadas con un ácido nucleico que expresa el receptor de PsaA.
- [0080]** Específicamente se proporciona el uso de un péptido P4 para preparar un medicamento para inhibir la
- 25 unión de o la adhesión de PsaA a células epiteliales nasofaríngeas, que comprende poner en contacto la célula con un péptido P4, por ejemplo, un péptido que comprende o que consiste en el péptido de la SEC ID N° 1 o variantes o análogos del mismo, o un péptido que comprende o que consiste en el péptido de la SEC ID N° 2 o variantes o análogos del mismo.
- 30 **[0081]** Se proporciona un péptido P4 para su uso en la inhibición de la unión de *S. pneumoniae* a células que expresan un receptor de PsaA, poniendo en contacto la célula con el péptido P4. Por ejemplo, el péptido P4 puede comprender o consistir en el péptido de la SEC ID N° 1 o variantes o análogos del mismo.
- [0082]** Específicamente se proporciona un péptido P4 para su uso en la inhibición de la unión de o adhesión de *S.*
- 35 *pneumoniae* a células epiteliales nasofaríngeas, poniendo en contacto la célula con un péptido P4, por ejemplo, un péptido que comprende o que consiste en el péptido de la SEC ID N° 1 o variantes o análogos del mismo.
- [0083]** Se proporciona un péptido P4 para su uso en la inhibición de la unión de *S. pneumoniae* transparente a células que expresan un receptor de PsaA y la potenciación de la captación de la bacteria, poniendo en contacto la
- 40 célula con un péptido P4. Por ejemplo, el péptido P4 puede comprender o consistir en el péptido de la SEC ID N° 1 o variantes o análogos del mismo. *S. pneumoniae* experimenta variación de fase espontánea en la morfología de las colonias. Se ha demostrado previamente que diferencias en la opacidad de las colonias se correlacionan con diferencias en la capacidad de los organismos de colonizar la superficie mucosa de la nasofaringe en un modelo animal. El fenotipo transparente coloniza tejido en la nasofaringe. Una vez opaca, la bacteria se capta (internaliza)
- 45 por fagocitosis en presencia de péptido P4.
- [0084]** P4 puede actuar como transductor de señales, causando que las células epiteliales se regulen positivamente y se conviertan en células fagocíticas activas de modo que se aumente la internalización. Esto permite que el fenotipo opaco sea internalizado. Así, se proporciona un péptido P4 para su uso en la potenciación de la
- 50 internalización de neumococos mediante el contacto de las células de la nasofaringe con un péptido P4. Como la unión de PsaA a receptores celulares desencadena otros acontecimientos que son únicos para la interacción de PsaA o P4 y los receptores celulares, estos acontecimientos se desencadenan mediante los péptidos P4 descritos. Por ejemplo, se aprecia la reducción en IL-8, IL-16 y EGF. También se observan ondulamiento de la membrana y cambios en los perfiles proteicos asociados a la membrana en células eucariotas. Así, los acontecimientos corriente
- 55 abajo reconocidos del contacto de PsaA con su receptor se estimulan mediante el contacto de un péptido P4 descrito con las células. Para
- [0085]** Se proporciona un péptido P4 para su uso en el aumento de la expresión de una citoquina por una célula, administrando un péptido P4 a la célula. El FGFbásico es una citoquina que desempeña una importante tarea en la
- 60 diferenciación tisular y la angiogénesis en estado embrionario. Además, esta citoquina tiene la capacidad única de aumentar el desarrollo de las células neurales y la curación de heridas. El FGFbásico producido por células tratadas con P4 potencia el crecimiento de fibroblastos. Así, un aumento en FGFbásico como se muestra en la presente memoria puede acelerar la curación de heridas. Para
- 65 **[0086]** Se proporciona un péptido P4 para su uso en la disminución de la expresión de una citoquina por una

- célula, administrando un péptido P4. La disminución se ejemplifica en la presente memoria con IL-8, IL-16 y EGF. El EGF es una quimioquina de tipo C-X-C que desempeña la tarea principal en la transformación de tumor benigno en maligno. Esto se realiza regulando negativamente la expresión de E-cadherina, el adhesivo de unión que une y mantiene la integridad celular con las células adyacentes. En células tumorales, una producción potenciada de EGF conduce a la regulación negativa de la expresión de E-cadherina que a su vez inicia la metástasis tumoral. El tratamiento con péptido P4 reduce la producción de EGF en las células tratadas de un modo dependiente de la dosis. Por tanto, este péptido puede desempeñar una tarea principal en la reversión o retardo de la metástasis tumoral.
- 5
- 10 **[0087]** Se muestran anticuerpos anti-P4 en la presente memoria para inhibir la unión de P4 a células. Así, se proporciona un péptido P4 para su uso en la inhibición de la unión de PsaA a células que expresan un receptor de PsaA, poniendo en contacto la PsaA con un anticuerpo específico para P4 descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser específico para un péptido P4 que comprende o que consiste en el péptido de la SEC ID N° 1 o variantes o análogos del mismo.
- 15
- [0088]** Específicamente se proporciona un péptido P4 para su uso en la inhibición de la unión de o la adhesión de PsaA a células epiteliales nasofaríngeas, poniendo en contacto la célula con un anticuerpo específico para P4 descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser específico para un péptido que comprende o que consiste en el péptido de la SEC ID N° 1 o variantes o análogos del mismo.
- 20
- [0089]** Se proporciona un péptido P4 para su uso en la inhibición de la unión de *S. pneumoniae* a células que expresan un receptor de PsaA, poniendo en contacto el *S. pneumoniae* con un anticuerpo específico para P4 descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser específico para un péptido P4 que comprende o que consiste en el péptido de la SEC ID N° 1 o variantes o análogos del mismo.
- 25
- [0090]** Se proporciona un péptido P4 para su uso en la inhibición de la unión de *S. pneumoniae* a células que expresan un receptor de PsaA, poniendo en contacto el *S. pneumoniae* con un anticuerpo específico para P4 descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser específico para un péptido P4 que comprende o que consiste en el péptido de la SEC ID N° 2 o variantes o análogos del mismo. En
- 30
- [0091]** Específicamente se proporciona un péptido P4 para su uso en la inhibición de la unión de o adhesión de *S. pneumoniae* a células epiteliales nasofaríngeas, poniendo en contacto la célula con un anticuerpo específico para P4 descrito en la presente memoria. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser específico para un péptido que comprende o que consiste en el péptido de la SEC ID N° 1 o variantes o análogos del mismo.
- 35
- [0092]** Se proporciona un péptido P4 para su uso en la inhibición de la unión de PsaA a una célula diana que expresa un receptor de PsaA, poniendo en contacto la PsaA con un receptor aislado o soluble de PsaA o dominio (fragmento) de unión a P4 del mismo. También puede aislarse el sitio de unión a PsaA en el receptor (es decir, son fragmentos del receptor). El receptor o sitios de unión a PsaA solubilizado puede usarse como bloqueante de la unión de PsaA a las células. La eficacia de una región del receptor de PsaA como bloqueante de la unión de *S. pneumoniae* a una célula se determina usando los ensayos convencionales de bloqueo descritos en la presente memoria y en la técnica.
- 40
- [0093]** Cuando se inhibe la unión de PsaA a células que expresan un receptor de PsaA, la PsaA puede estar en la célula bacteriana de *S. pneumoniae* (por ejemplo, para tratar/prevenir una infección o uso de investigación). Así, se proporciona un péptido P4 para su uso en el tratamiento o prevención de infecciones por *S. pneumoniae*, inhibiendo la unión de PsaA a células que expresan un receptor de PsaA usando un péptido P4 o anticuerpo contra el mismo. Los términos "tratar", "tratamiento" o "tratando" significan administrar una composición a un sujeto con una afección, en el cual la afección puede ser cualquier enfermedad patológica, cáncer, infección, o afección inflamatoria. El efecto de la administración al sujeto puede tener el efecto de, aunque sin limitación, reducir los síntomas de la afección, reducir la gravedad de la afección, o eliminar completamente la afección. Por "prevenir", "prevención" o "previniendo" se entiende minimizar las posibilidades de que un sujeto desarrolle una enfermedad o afección resultante de infección por *S. pneumoniae*. Un "sujeto" es un individuo. Así, el "sujeto" puede incluir animales domésticos, tales como gatos, perros, etc., ganado (por ejemplo, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.), animales de laboratorios (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, cobayas, etc.) y aves. Preferentemente, el sujeto es un mamífero tal como un primate, y más preferentemente, un ser humano.
- 50
- [0094]** Para prevenir o tratar una infección por *S. pneumoniae*, se administra una vacuna que comprende un péptido P4 (por ejemplo, el péptido de la SEC ID N° 1 o una variante del mismo) a un sujeto en un protocolo de inmunización. La inmunización provoca la producción de anticuerpos anti-*S. pneumoniae*. Estos anticuerpos también son anticuerpos anti-PsaA y anti-P4. Los anticuerpos producidos en el sujeto como resultado de la inmunización reducen la carga bacteriana portada en el sujeto, particularmente en la nasofaringe donde *S. pneumoniae* tiende a portarse. En algunos casos, la inmunización provoca la erradicación completa de *S. pneumoniae*. En otros casos, la inmunización provoca una disminución medible en la cantidad de *S. pneumoniae* presente en el sujeto. Así, el
- 55
- 60
- 65

refiere a un estado en que un sujeto ha generado anticuerpos, al menos algunos de los cuales son anticuerpos neutralizantes, en respuesta a la exposición a un inmunógeno relacionado con el patógeno (por ejemplo, un péptido P4). Los anticuerpos neutralizantes se unen al componente inmunogénico del *S. pneumoniae* de tal modo que se inhibe o anula la infección proliferativa, de modo que el sujeto queda esencialmente libre de enfermedad sintomática o tiene síntomas reducidos. La inmunidad protectora también puede surgir de una respuesta inmunogénica alternativa que conduce a inactivación, pérdida, o destrucción del agente patogénico. Cuando se realiza antes de la exposición a *S. pneumoniae*, el método de inmunización evita la infección (medida como carga bacteriana no significativa recuperada de la NP) o provoca una disminución medible en la cantidad de *S. pneumoniae* presente en el sujeto (medida como una reducción en la carga bacteriana recuperada de la NP en comparación con los controles).

**[0095]** Para su uso en la prevención o tratamiento de una infección por *S. pneumoniae*, se proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-P4 (por ejemplo, un anticuerpo específico para el péptido de la SEC ID N° 1 o una variante del mismo) para su administración a un sujeto en un protocolo de inmunización. Este método de inmunización pasiva provoca la presencia de anticuerpos anti-*S. pneumoniae* en el sujeto. Estos anticuerpos también son anticuerpos anti-PsaA y anti-P4. Los anticuerpos reducen la carga bacteriana portada en el sujeto, particularmente en la nasofaringe donde *S. pneumoniae* tiene a portarse. En algunos casos, la inmunización provoca la erradicación completa de *S. pneumoniae*. En otros casos, la inmunización provoca una disminución medible en la cantidad de *S. pneumoniae* presente en el sujeto. Cuando se realiza antes de la exposición a *S. pneumoniae*, el método de inmunización pasiva evita la infección (medida como carga bacteriana no significativa recuperada de la NP) o provoca una disminución medible en la cantidad de *S. pneumoniae* presente en el sujeto (medida como una reducción en la carga bacteriana recuperada de la NP en comparación con los controles). Para

**[0096]** En base a su similitud de secuencia con P4 de *S. pneumoniae* en la proteína homóloga, se tratan o previenen infecciones por otras bacterias, incluyendo *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. parasanguis*, *S. agalactae*, *S. pyogenes*, *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, etc.).

**[0097]** Para inhibir la unión de PsaA a células que expresan un receptor de PsaA, la PsaA puede ser una proteína aislada (por ejemplo, para uso de investigación). Así, se describe un método para usar un péptido P4 para estudiar la interacción de *S. pneumoniae* y PsaA con células. También se proporciona un método para usar un anticuerpo específico para P4 para estudiar la interacción descrita de *S. pneumoniae* y PsaA con células.

**[0098]** En los métodos descritos, las composiciones descritas pueden usarse terapéuticamente en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

**[0099]** La composición farmacéutica puede administrarse de varios modos dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico, y del área a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica, vaginal, rectal, intranasal), oral, por inhalación, o parenteral, por ejemplo por goteo intravenoso, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Los anticuerpos descritos pueden administrarse por vía intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavidad, transdérmica o por inhalación.

**[0100]** El suministro intranasal puede ser por administración intranasal tópica o administración mediante inhalante. Como se usa en la presente memoria, "administración intranasal tópica" significa el suministro de las composiciones en la nariz y fosas nasales a través de uno o ambos orificios y puede comprender el suministro mediante un mecanismo de pulverización o mecanismo de goteo, o a través de aerosolización del ácido nucleico o vector. La administración de las composiciones mediante inhalante puede ser a través de la nariz o la boca mediante suministro por un mecanismo de pulverización o goteo. El suministro también puede ser directamente a cualquier área del sistema respiratorio (por ejemplo, pulmones) mediante intubación.

**[0101]** La administración parenteral de la composición, si se usa, se caracteriza generalmente por inyección. Pueden prepararse inyectables en formas convencionales, en forma de soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución de suspensión en líquido antes de la inyección, o en forma de emulsiones. Un enfoque más recientemente revisado para administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida de modo que se mantenga una dosificación constante. Véase, por ejemplo, la patente US 3.610.795.

**[0102]** Los materiales pueden estar en solución, suspensión (por ejemplo, incorporada en micropartículas, liposomas, o células). Estos pueden estar dirigidos a un tipo celular particular mediante anticuerpos, receptores, o ligandos de receptor.

**[0103]** Cuando se usan en los tratamientos anteriores u otros tratamientos, puede emplearse una cantidad terapéuticamente eficaz de uno de los compuestos (por ejemplo, péptido P4 o anticuerpo contra P4) de la presente invención en forma pura o, cuando dicha forma existe, forma de sal farmacéuticamente aceptable y con o sin un excipiente farmacéuticamente aceptable.



**[0104]** E nivel de dosis específico terapéuticamente eficaz para cualquier paciente particular dependerá de uno o más factores incluyendo el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración; la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Así, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición. Sin embargo, un experto en la materia puede determinar una cantidad apropiada usando solamente experimentación rutinaria dados los contenidos de la presente memoria. Por ejemplo, es bien conocido dentro de la experiencia en la materia el inicio de dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y el aumento gradual de la dosificación hasta conseguir el efecto deseado. Si se desea, la dosis diaria eficaz puede dividirse en múltiples dosis con fines de administración. Por consiguiente, composiciones de dosis individual pueden contener estas cantidades o submúltiplos de las mismas para constituir la dosis diaria.

**[0105]** La dosificación puede ajustarse por el médico individual en el caso de cualquier contraindicación. La dosificación puede variar, y puede administrarse en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días. Pueden encontrarse directrices en la bibliografía para dosificaciones apropiadas para clases dadas de productos farmacéuticos. Por ejemplo, pueden encontrarse directrices sobre la selección de dosis apropiadas para anticuerpos en la bibliografía sobre usos terapéuticos de anticuerpos, por ejemplo, Handbook of Monoclonal Antibodies, Ferrone et al., eds., Noyes Publications, Park Ridge, N.J., (1985) cap. 22 y pág. 303-357; Smith et al., Antibodies in Human Diagnosis and Therapy, Haberetal., eds., Raven Press, Nueva York (1977) pág. 365-389. una dosis diaria típica del péptido P4 usado en solitario puede variar de aproximadamente 0,1 µg a 0,1 mg por kilogramo de peso corporal al día, por ejemplo de aproximadamente 2,5 a 5 µg por kilogramo de peso corporal al día, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

**[0106]** En los métodos para inhibir la unión administrando los péptidos y anticuerpos descritos en la presente memoria, pueden administrarse péptidos adicionales o anticuerpos dirigidos contra otros estreptococos o bacterias gram negativas. De este modo, se tratan o previenen tanto infecciones por *S. pneumoniae* como infecciones por otros estreptococos (por ejemplo, *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. parasanguis*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes*, etc.).

#### Métodos de selección

**[0107]** Se proporciona un método para identificar un anticuerpo que inhiba o bloquee la unión de la proteína adhesina A de superficie de neumococos (PsaA) a células que expresan un receptor de PsaA. El método comprende: a) poner en contacto las células con PsaA y un péptido P4 en presencia o ausencia del anticuerpo inhibidor putativo; y b) determinar la cantidad de unión del péptido P4 a las células en presencia y ausencia del anticuerpo inhibidor putativo, mediante el cual una cantidad reducida de unión del péptido P4 en presencia del anticuerpo en comparación con la cantidad de unión del péptido P4 en ausencia del anticuerpo identifica el anticuerpo como un anticuerpo que bloquea la unión de PsaA de neumococos a las células.

**[0108]** Se proporciona un método para identificar un anticuerpo que inhiba o bloquee la unión de *S. pneumoniae* a células que expresan un receptor de PsaA. En un ejemplo, el método comprende: a) poner en contacto las células con PsaA y un péptido P4 en presencia o ausencia del anticuerpo inhibidor putativo; y b) determinar la cantidad de unión del péptido P4 a las células en presencia y ausencia del anticuerpo inhibidor putativo, mediante lo cual una cantidad reducida de unión del péptido P4 en presencia del anticuerpo en comparación con la cantidad de unión del péptido P4 en ausencia del anticuerpo identifica el anticuerpo como un anticuerpo que bloquea la unión de PsaA de neumococos de un *S. pneumoniae* a células epiteliales. En el método para identificar un anticuerpo que bloquee la unión de *S. pneumoniae* a células, la PsaA puede estar aislada (es decir, la PsaA no está en una célula bacteriana). Alternativamente, la PsaA puede expresarse en una célula de *S. pneumoniae*.

**[0109]** Se proporciona un método para detectar anticuerpos anti-*S. pneumoniae* en un sujeto o en una muestra de un sujeto. Como el péptido P4 representa un epítipo de la proteína PsaA de *S. pneumoniae*, puede usarse para detectar anticuerpos anti-*S. pneumoniae*. Así, se proporciona un método para diagnosticar infecciones en curso o previas de *S. pneumoniae*. Se ejemplifican protocolos para detectar la unión entre el péptido P4 y anticuerpos anti-*S. pneumoniae* en la presente memoria. Los métodos para usar P4 son esencialmente iguales a los métodos para usar PsaA para detectar anticuerpos anti-*S. pneumoniae*, que son conocidos en la técnica. El presente método tiene la ventaja de usar un péptido más pequeño, por ejemplo, un péptido P4 en los ensayos de detección.

**[0110]** Los métodos de diagnóstico y otros métodos de detección descritos pueden hacer uso de la unión selectiva de un anticuerpo a un antígeno. La unión selectiva a un anticuerpo en dichas condiciones puede requerir la selección de un anticuerpo por su especificidad por una proteína particular, proteoglucano, o variante, fragmento, o núcleo proteico de los mismos. Puede usarse una diversidad de formas de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que se unan selectivamente con el péptido P4 o variante del mismo. Por ejemplo, se usan de forma rutinaria inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos selectivamente inmunorreactivos con un

péptido. Véase Harlow y Lane. *Antibodies, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York, (1988), para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que podrían usarse para determinar la unión selectiva. La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

5

**[0111]** Habiendo proporcionado el péptido P4 y habiendo demostrado que se une al receptor de PsaA en las células, se proporciona un método para seleccionar otros receptores de PsaA. El método puede comprender poner en contacto las células que expresan el receptor putativo con P4 ligado a un resto detectable y detectar la presencia del marcador en la célula, indicando la presencia del marcador la presencia de un receptor de P4. El método puede usarse con células intactas o fracciones de membrana de las células para facilitar el aislamiento de la proteína receptora. Por ejemplo, puede usarse P4 en ensayos de cambio de movilidad para identificar el receptor celular de PsaA. También puede usarse para regular positivamente la expresión del receptor celular.

**[0112]** Como se usa en la presente memoria, la expresión "resto detectable" es cualquier medio para detectar una interacción entre una marca y un compañero de unión, de manera que se identifique la presencia de la marca y la existencia de la información estructural o sintética que la marca representa. El marcador puede ser cualquier medio de detección que pueda ensayarse. El marcador proporciona una "señal" que indica que se está identificando la marca. Éstos incluyen, aunque sin limitación, enzimas, fluoróforos, biotina, cromóforos, radioisótopos, partículas coloreadas, restos electroquímicos, de modificación química o quimioluminescentes. Un resto detectable actualmente preferido es un resto fluorescente. Los restos fluorescentes habituales incluyen: fluoresceína, colorantes de cianuro, cumarinas, ficoeritrina, ficobiliproteínas, cloruro de dansilo, rojo Texas, y complejos de lantánidos. Por supuesto, los derivados de estos compuestos que son conocidos para los expertos en la materia también se incluyen como restos fluorescentes habituales. Otros ejemplos incluyen enzimas que pueden catalizar reacciones que emiten color o luz (luminescencia). La detección del resto detectable puede ser directa con la condición de que el resto detectable sea detectable en sí mismo, tal como, por ejemplo, en el caso de fluoróforos. Alternativamente, la detección del resto detectable puede ser indirecta. En el último caso, preferentemente se emplea un segundo resto que reacciona con el resto detectable, siendo en sí mismo directamente detectable. El resto detectable puede ser inherente a la sonda molecular. Por ejemplo, la región constante de un anticuerpo puede servir como resto detectable indirecto al cual se puede unir un segundo anticuerpo que tiene un resto detectable directo.

**[0113]** Se proporciona un método para identificar un mimético de un receptor de PsaA. Como la conformación del receptor se conoce a partir de la conformación de P4, los miméticos también se definen por la presencia de una estructura complementaria al péptido P4. Éstos se identifican y aíslan de forma rutinaria en base a su unión al péptido P4. Usando los métodos descritos en la presente memoria y en otras partes, pueden prepararse moléculas y confirmarse su unión a P4.

**[0114]** Se proporciona un método para identificar un mimético de un péptido P4. El método puede usarse para identificar y producir péptidos y moléculas pequeñas que retengan las características estructurales clave de P4, por ejemplo, la conformación de P4. Por "moléculas pequeñas" se entienden moléculas orgánicas naturales o sintéticas de menos de aproximadamente 5 kD y más preferentemente de menos de aproximadamente 4 kD. Las moléculas pequeñas pueden ser ácido nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas (que contienen carbono) o inorgánicas.

**[0115]** Un ejemplo de un modo para aislar moléculas que imitan P4 o el receptor de PsaA es a través de diseño racional. Esto se consigue a través de la información estructural y modelado informático. La tecnología de modelado informático permite la visualización de la estructura atómica tridimensional de una molécula seleccionada y el diseño racional de nuevos compuestos que interaccionarán con la molécula. La construcción tridimensional típicamente depende de los datos de análisis cristalográficos de ratos x o imágenes de RMN de la molécula seleccionada. La dinámica molecular requiere datos de campos de fuerza. Los sistemas gráficos informáticos posibilitan la predicción del modo en que un nuevo compuesto se unirá a la molécula diana y permiten la manipulación experimental de las estructuras del compuesto y la molécula diana para una especificidad de unión ideal. La predicción de cuál será la interacción molécula-compuesto cuando se hacen pequeños cambios en uno o ambos requiere un software de mecánica molecular y ordenadores de alta intensidad computacional, habitualmente acoplados con interfaces accesibles y guiadas por menús entre el programa de diseño molecular y el usuario.

**[0116]** Ejemplos de sistemas de modelado molecular son los programas CHARMm y QUANTA, Polygen Corporation, Waltham, MA. CHARMm realiza las funciones de minimización de energía y dinámica molecular. QUANTA realiza la construcción, modelado gráfico y análisis de la estructura molecular. QUANTA permite la construcción interactiva, la modificación, visualización, y análisis del comportamiento de las moléculas entre sí.

**[0117]** Varios artículos revisan el modelado informático de fármacos interactivos con proteínas específicas, tales como Rotivinen, et al., 1988 *Acta Pharmaceutica Fennica* 97, 159-166; Ripka, *New Scientist* 54-57 (Junio 16, 1988); McKinaly y Rossmann, 1989 *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29,111-122; Perry y Davies, *QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design* pág. 189-193 (Alan R. Liss, Inc. 1989); Lewis y Dean, 1989 *Proc. R.*

Soc. Lond. 236, 125-140 y 141-162; y, con respecto a una enzima modelo para componentes de ácido nucleico, Askew, et al., 1989 J. Am. Chem. Soc. 111, 1082-1090. Están disponibles otros programas informáticos para seleccionar y representar gráficamente agentes químicos en compañías tales como BioDesign, Inc., Pasadena, CA., Allelix, Inc, Mississauga, Ontario, Canadá, e Hypercube, Inc., Cambridge, Ontario. Aunque se ejemplifican para la aplicación a fármacos específicos para proteínas particulares, pueden usarse para diseñar péptidos y fármacos que imiten P4 o el receptor de PsaA.

**[0118]** En los métodos de selección descritos, la célula usada en el método puede ser cualquier célula que exprese un receptor de PsaA, por ejemplo, neumocitos, células epiteliales o células endoteliales. La célula puede, alternativamente, ser una célula modificada por ingeniería que exprese un receptor mimético (por ejemplo, un dominio de unión a PsaA). En el método, la PsaA puede estar en una célula bacteriana. Alternativamente, en el método, la PsaA puede estar purificada. La PsaA purificada puede unirse a una superficie vehículo tal como una microesfera o superficie similar.

**[0119]** La química combinatoria incluye, aunque sin limitación, todos los métodos para aislar macromoléculas que son capaces de unirse o imitar una molécula pequeña u otra macromolécula. Proteínas, oligonucleótidos, y azúcares son ejemplos de macromoléculas. La exploración de series de moléculas para una actividad deseada ya sea en base a bibliotecas orgánicas pequeñas, oligonucleótidos, o anticuerpos se conoce ampliamente como química combinatoria. Las técnicas combinatorias son particularmente adecuadas para definir interacciones de unión entre moléculas y para aislar moléculas que tienen la actividad de unión específica, a menudo llamadas aptámeros cuando las macromoléculas son ácido nucleicos.

**[0120]** Existen varios métodos para aislar proteínas que tienen la actividad especificada o una actividad modificada. Por ejemplo, se han usado bibliotecas de presentación en fagos durante varios años.

**[0121]** Se describe un método preferido para aislar proteínas que tienen una función dada por Roberts y Szostak (Roberts R.W. y Szostak J.W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23)12997-302 (1997)). Este método de química combinatoria acopla la potencia funcional de las proteínas y la potencia genética de los ácido nucleicos. Se genera una molécula de ARN en que se une covalentemente una molécula de puromicina al extremo 3' de la molécula de ARN. Una traducción in vitro de esta molécula de ARN modificada causa la proteína correcta, codificada por el ARN a traducir. Además, a causa de la unión de la puromicina, un aceptor de peptidilo que no puede prolongarse, la cadena de péptido creciente se une a la puromicina que está unida al ARN. Así, la molécula proteica se une al material genético que la codifica. Ahora pueden hacerse procedimientos de selección in vitro normales para aislar los péptidos funcionales. Una vez completo el procedimiento de selección para la función peptídica, se realizan procedimientos tradicionales de manipulación de ácido nucleico para amplificar el ácido nucleico que codifica los péptidos funcionales deseados. Después de la amplificación del material genético, se transcribe el nuevo ARN con puromicina en el extremo 3', se traduce el nuevo péptido y se realiza otra ronda de selección funcional. Así, la selección de proteínas puede realizarse de un modo iterativo justo como las selecciones de ácido nucleico. El péptido que se traduce está controlado por la secuencia del ARN unido a la puromicina. Esta secuencia puede ser cualquier cosa desde una secuencia aleatoria modificada por ingeniería para una traducción óptima (es decir, sin codones de parada etc.) o puede ser una secuencia degenerada de una molécula de ARN conocida para buscar una función mejorada o alterada de un péptido conocido. Las condiciones para la amplificación del ácido nucleico y la traducción in vitro son bien conocidas para los expertos en la materia y se realizan preferentemente como en Roberts y Szostak (Roberts R.W. y Szostak J.W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23)12997-302 (1997)).

**[0122]** Se describe otro método preferido para métodos combinatorios concebidos para aislar péptidos en Cohen et al. (Cohen B.A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(24): 14272-7 (1998)). Este método utiliza y modifica tecnología de doble híbrido. Son útiles sistemas de doble híbrido de levadura para la detección y análisis de interacciones proteína:proteína. El sistema de doble híbrido, inicialmente descrito en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es una potente técnica de genética molecular para identificar nuevas moléculas reguladoras, específicas para la proteína de interés (Fields y Song, Nature 340:245-6 (1989)). Cohen et al., modificaron esta tecnología de modo que pudieran identificarse nuevas interacciones entre secuencias peptídicas sintéticas o modificadas por ingeniería que se unen a una molécula de elección. El beneficio de este tipo de tecnología es que la selección se hace en un entorno intracelular. El método utiliza una biblioteca de moléculas peptídicas que se unen a un dominio de activación ácido. Un péptido P4, por ejemplo la SEC ID N° 1, se une a un dominio de unión a ADN de una proteína de activación de la transcripción, tal como Gal 4. Realizando la técnica de doble híbrido sobre este tipo de sistema, se identifican moléculas que se unen a P4 (por ejemplo, receptores).

**[0123]** Usando metodologías bien conocidas para los expertos en la materia, en combinación con diversas bibliotecas combinatorias, se pueden aislar y caracterizar aquellos que se unen a o interaccionan con P4 o el receptor de PsaA. La afinidad de unión relativa de estos compuestos puede compararse e identificarse los compuestos óptimos usando estudios de unión competitiva, que son bien conocidos para los expertos en la materia.

**[0124]** Las técnicas para preparar bibliotecas combinatorias y explorar bibliotecas combinatorias para aislar moléculas que se unen a una diana deseada son bien conocidas para los expertos en la materia. Pueden

- encontrarse técnicas y métodos representativos en, aunque sin limitación, las patentes US 5.084.824, 5.288.514, 5.449.754, 5.506.337, 5.539.083, 5.545.568, 5.556.762, 5.565.324, 5.565.332, 5.573.905, 5.618.825, 5.619.680, 5.627.210, 5.646.285, 5.663.046, 5.670.326, 5.677.195, 5.683.899, 5.688.696, 5.688.997, 5.698.685, 5.712.146, 5.721.099, 5.723.598, 5.741.713, 5.792.431, 5.807.683, 5.807.754, 5.821.130, 5.831.014, 5.834.195, 5.834.318, 5.834.588, 5.840.500, 5.847.150, 5.856.107, 5.856.496, 5.859.190, 5.864.010, 5.874.443, 5.877.214, 5.880.972, 5.886.126, 5.886.127, 5.891.737, 5.916.899, 5.919.955, 5.925.527, 5.939.268, 5.942.387, 5.945.070, 5.948.696, 5.958.702, 5.958.792, 5.962.337, 5.965.719, 5.972.719, 5.976.894, 5.980.704, 5.985.356, 5.999.086, 6.001.579, 6.004.617, 6.008.321, 6.017.768, 6.025.371, 6.030.917, 6.040.193, 6.045.671, 6.045.755, 6.060.596, y 6.061.636.
- 10 **[0125]** Pueden prepararse bibliotecas combinatorias a partir de una amplia serie de moléculas usando varias técnicas sintéticas diferentes. Por ejemplo, bibliotecas que contienen 2,4-pirimidinonas condensadas (patente US 6.025.371) dihidrobenzopiranos (patente US 6.017.768 y 5.821.130), alcoholes de amida (patente US 5.976.894), amidas hidroxiaminoácidos (patente US 5.972.719) carbohidratos (patente US 5.965.719), 1,4-benzodiazepin-2,5-dionas (patente US 5.962.337), cíclicas (patente US 5.958.792), amidas de biarilaminoácidos (patente US 5.948.696), tiofenos (patente US 5.942.387), tetrahidroquinolinas tricíclicas (patente US 5.925.527), benzofuranos (patente US 5.919.955), isoquinolinas (patente US 5.916.899), hidantoína y tiohidantoína (patente US 5.859.190), indoles (patente US 5.856.496), imidazol-piridindol e imidazol-piridobenzotiofenos (patente US 5.856.107) 2-metileno-2, 3-dihidrotiazoles sustituidos (patente US 5.847.150), quinolinas (patente US 5.840.500), PNA (patente US 5.831.014), que contienen marcas (patente US 5.721.099), policétidos (patente US 5.712.146), subunidades morfolino (patente US 5.698.685 y 5.506.337), sulfamidas (patente US 5.618.825), y benzodiazepinas (patente US 5.288.514).

#### Métodos de diagnóstico

- 25 **[0126]** Los usos diagnósticos de los anticuerpos de la invención son adecuados para su uso en inmunoensayos en que pueden utilizarse en fase líquida o unidos a un vehículo de fase sólida. Además, los anticuerpos monoclonales en estos inmunoensayos pueden marcarse de forma detectable de diversos modos. Ejemplos de tipos de inmunoensayos que pueden utilizar anticuerpos monoclonales de la invención son inmunoensayos competitivos y no competitivos en forma directo o indirecto. Ejemplos de dichos inmunoensayos son el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo tipo sándwich (inmunométrico). La detección de los antígenos usando los anticuerpos monoclonales de la invención puede hacerse utilizando inmunoensayos que se ejecutan en modo directo, inverso, o simultáneo, incluyendo ensayos inmunohistoquímicos sobre muestras fisiológicas.

- [0127]** Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden unirse a muchos vehículos diferentes y usarse para detectar la presencia de antígenos específicos de PsaA de *S. pneumoniae*, por ejemplo un péptido P4 (por ejemplo, SEC ID N° 1). Ejemplos de vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble o insoluble para los propósitos de la invención. Los expertos en la materia conocerán otros vehículos adecuados para la unión de anticuerpos monoclonales, o serán capaces de determinarlos, usando experimentación rutinaria.

- [0128]** Existen muchos y diferentes marcadores y métodos de marcaje conocidos para los expertos en la materia como se describe adicionalmente en la presente memoria. Los expertos en la materia conocerán otros marcadores adecuados para su unión al anticuerpo monoclonal, o serán capaces de determinarlos, usando experimentación rutinaria. Además, la unión de estos marcadores al anticuerpo monoclonal de la invención puede hacerse usando técnicas convencionales habituales para los expertos en la materia. Normalmente, una "muestra" como se usa en la presente memoria es un líquido tal como orina, saliva, fluido cefalorraquídeo, sangre, suero y similares, o un sólido o semi-sólido tal como tejidos, heces, y similares. Otros posibles ejemplos de fluidos corporales incluyen secreciones nasales, esputo, moco y similares. Otra técnica que también puede provocar mayor sensibilidad consiste en acoplar los anticuerpos a haptenos de bajo peso molecular. Estos haptenos después pueden detectarse específicamente mediante una segunda reacción. Por ejemplo, es habitual usar haptenos tales como biotina, que reacciona con avidina, o dinitrofenilo, piridoxal, y fluoresceína, que pueden reaccionar con anticuerpos anti-hapteno específicos. Como se usa en esta invención, se entiende que el término "epítipo" incluye cualquier determinante con capacidad de interacción específica con los anticuerpos monoclonales de la invención. Los determinantes epitópicos habitualmente consisten en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y habitualmente tienen características tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

- [0129]** La presente invención proporciona un método para detectar infecciones por *S. pneumoniae* en un sujeto, que comprende las etapas de poner en contacto una muestra que contiene anticuerpo del sujeto con una cantidad detectable de los antígenos P4 de la presente invención, en condiciones de reacción adecuadas, y detectar la reacción del péptido y el anticuerpo específicamente reactivo con el mismo, indicando la reacción la presencia de *S. pneumoniae* o infección previa con *S. pneumoniae*. Las cantidades detectables de los presentes antígenos pueden determinarse empíricamente. La concentración de un antígeno individual en una mezcla también puede determinarse empíricamente.

**[0130]** Un ejemplo del método para detectar un organismo o proteína que posee el antígeno P4 o variantes se realiza poniendo en contacto una muestra de fluido o tejido del sujeto con una cantidad de un anticuerpo purificado específicamente reactivo con el antígeno, y detectando la reacción del ligando con el antígeno. Se contempla que el antígeno estará sobre células intactas de *S. pneumoniae* o células infectadas por *S. pneumoniae* que expresan el antígeno, o será fragmentos del antígeno. Como se contempla en la presente memoria, el anticuerpo incluye cualquier ligando que se una al antígeno P4, por ejemplo, un anticuerpo intacto, un fragmento de un anticuerpo u otro reactivo que tenga reactividad con el antígeno.

**[0131]** Pueden adaptarse fácilmente inmunoensayos enzimáticos tales como ensayos de inmunofluorescencia (IFA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) e inmunotransferencia para conseguir la detección de los anticuerpos. Un método ELISA eficaz para la detección de los anticuerpos puede ser, por ejemplo, el siguiente: (1) unir el antígeno a un sustrato; (2) poner en contacto el antígeno unido con una muestra de fluido o tejido que contiene el anticuerpo; (3) poner en contacto lo anterior con un anticuerpo secundario unido a un resto detectable que se reactiva con el anticuerpo unido (por ejemplo, enzima peroxidasa de rábano picante o enzima fosfatasa alcalina); (4) poner en contacto lo anterior con el sustrato para la enzima; (5) poner en contacto lo anterior con un reactivo generador de color en condiciones que permitan el desarrollo de una reacción de color; (6) observar el cambio de color.

**[0132]** Otra técnica inmunológica que puede ser útil en la detección de *S. pneumoniae* o infección previa por *S. pneumoniae* utiliza anticuerpos monoclonales (MAb) para la detección de anticuerpos específicamente reactivos con antígenos P4. En resumen, se hace reaccionar el suero del sujeto con el antígeno unido a un sustrato (por ejemplo, una placa ELISA de 96 pocillos). El exceso de suero se retira por lavado minucioso. Después se hace reaccionar un anticuerpo monoclonal marcado (ligado a enzima, fluorescente, radiactivo, etc.) con el complejo antígeno-anticuerpo sérico reaccionado previamente. La cantidad de inhibición de la unión del anticuerpo monoclonal se mide con relación a un control (sin anticuerpo sérico del paciente). El grado de inhibición del anticuerpo monoclonal es un ensayo muy específico para una diversidad o cepa particular ya que se basa en la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal. Los MAb también pueden usarse para la detección directamente en células por IFA.

**[0133]** También puede usarse un ensayo de micro-aglutinación para detectar la presencia de anticuerpos anti-P4 en un sujeto. En resumen, se recubren perlas de látex, glóbulos rojos u otras partículas aglutinables con el antígeno y se mezclan con una muestra del sujeto, de modo que los anticuerpos en el tejido o los fluidos corporales que son específicamente reactivos con el antígeno se entrecruzan con el antígeno, causando aglutinación. Los complejos antígeno-anticuerpo aglutinados forman un precipitado, visible a simple vista o por espectrofotómetro. En una modificación del ensayo anterior, los anticuerpos específicamente reactivos con el antígeno pueden unirse a las perlas y el antígeno en el tejido o fluido corporal detectado de este modo.

**[0134]** Además, como en un ensayo sándwich típico, el anticuerpo puede unirse a un sustrato y hacerse reaccionar con el antígeno. Después de ello, se une un anticuerpo secundario marcado a los epítomos no reconocidos por el primer anticuerpo y se detecta el anticuerpo secundario. Como la presente invención proporciona antígenos P4 para la detección de *S. pneumoniae* o infección previa por *S. pneumoniae*, también pueden usarse otros métodos serológicos tales como citometría de flujo e inmunoprecipitación como métodos de detección.

**[0135]** En los métodos de diagnóstico mostrados en la presente memoria, el antígeno puede unirse a un sustrato y ponerse en contacto mediante una muestra de fluido tal como sangre, suero, orina o saliva. Esta muestra puede recogerse directamente del paciente o en una forma parcialmente purificada. De este modo, los anticuerpos específicos para el antígeno (el anticuerpo primario) reaccionarán específicamente con el antígeno unido. Después de ello, puede añadirse un anticuerpo secundario unido a, o marcado con, un resto detectable para potenciar la detección del anticuerpo primario. Generalmente, el anticuerpo secundario u otro ligando que sea reactivo, específicamente con un epítomo diferente del antígeno o no específicamente con el ligando o anticuerpo reaccionado, se seleccionará por su capacidad de reaccionar con múltiples sitios en el anticuerpo primario. Así, por ejemplo, pueden reaccionar varias moléculas del anticuerpo secundario con cada anticuerpo primario, haciendo al anticuerpo primario más detectable.

**[0136]** El kit de diagnóstico de la presente invención puede usarse para detectar la presencia de un anticuerpo primario específicamente reactivo con uno o más de los péptidos antigénicos de PsaA. El kit puede incluir el antígeno o antígenos P4 o PsaA de la presente invención unidos a un sustrato, un anticuerpo secundario reactivo con el anticuerpo específicamente reactivo con los antígenos seleccionados y un reactivo para detectar una reacción del anticuerpo secundario con el anticuerpo primario. Dicho kit puede ser un kit ELISA y puede comprender el sustrato, antígeno, anticuerpos primario y secundario cuando sea apropiado, y cualquier otro reactivo necesario tal como restos detectables, sustratos enzimáticos y reactivos de color como se ha descrito anteriormente. El kit de diagnóstico puede ser, alternativamente, un kit de inmunotransferencia que generalmente comprende los componentes y reactivos descritos en la presente memoria.

**[0137]** El kit de diagnóstico de la presente invención puede usarse para detectar la presencia de epítomos inmunogénicos de antígenos PsaA y P4 así como receptores de PsaA. El kit puede incluir anticuerpos seleccionados

unidos a un sustrato, un anticuerpo secundario reactivos con el antígeno y un reactivo para detectar una reacción del anticuerpo secundario con el antígeno, en el cual los anticuerpos seleccionados unidos al sustrato pueden ser inmunorreactivos con antígenos PsaA o receptores de PsaA. Dicho kit puede ser un kit ELISA y puede comprender el sustrato, los anticuerpos primario y secundario cuando sea apropiado, y cualquier otro reactivo necesario tal como

5 restos detectables, sustratos enzimáticos y reactivos de color como se ha descrito anteriormente. El kit de diagnóstico puede ser, alternativamente, un kit de inmunotransferencia que generalmente comprende los componentes y reactivos descritos en la presente memoria. El kit puede ser un kit de serie, donde PsaA o un péptido P4 es una de las dianas antigénicas.

10 **[0138]** Los reactivos particulares y otros componentes incluidos en los kits de diagnóstico de la presente invención pueden seleccionarse entre aquellos disponibles en la técnica de acuerdo con el método de diagnóstico específico puesto en práctica en el kit. Dichos kits pueden usarse para detectar el antígeno en muestras de tejido y fluido de un sujeto.

## 15 Secuencias

### [0139]

LFVESSVKRRPMKTVSQDTNIPIYAQIF (P4; SEC ID N° 1)  
 20 VPSLFDVSSVDDRPMTVSQDTNIPIYAQIFDTSIA (SEC ID N° 2)  
 TVSRVPWTAWAFHGY (P1; SEC ID N° 3)  
 RSYQHDLRAYGFWRL (P2; SEC ID N° 4)  
 LVRRFVHRRPHVE-SQ (P3; SEC ID N° 5)  
 X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>LFVESSVKRRPMKTVSQDTNIPIYAQIFX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub> (SEC ID N° 6)

25

donde X<sub>1</sub> es H, V, I o L

donde X<sub>2</sub> es H, P o G

donde X<sub>3</sub> es H, S o T

donde X<sub>4</sub> es H, T o S

30

donde X<sub>5</sub> es H o D, y

donde X<sub>6</sub> es H, S o T

LFVESSVDDRPMTVSKDTNIPIYAKIF (SEC ID N° 7)  
 LFVESSVDDRPMTVSKDTNIPIYSTIF (SEC ID N° 8)  
 35 LFVESSVDDRPMTVSKDTNIPIHAKIF (SEC ID N° 9)  
 LFVESSVDDRPMTVSKDSGIPYAEIF (SEC ID N° 10)  
 LFVESSVDRRPMETVSKDSGIPYSEIF (SEC ID N° 11)  
 LFVESSVDKRPMKSVSRESGIPYAEIF (SEC ID N° 12)  
 LFVESSVDDRPMTISKETGISIYSKIF (SEC ID N° 13)  
 40 LFVETSVDRRSMETVSKETNVPIAGTIF (SEC ID N° 14)  
 LFVETSVDRRSMESVSKETGVPIFAKIF (SEC ID N° 15)  
 QDTNIPIYAQI (SEC ID N° 16)  
 LFVESSVKRRPMKTVS (SEC ID N° 17)

## 45 Ejemplos

**[0140]** Los siguientes ejemplos se exponen para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completas del modo en que los compuestos, composiciones, artículos, dispositivos y/o métodos reivindicados en la presente memoria se preparan y evalúan, y pretender ser puramente ejemplares de la invención

50 y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben considerarse algunos errores y desviaciones. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, la temperatura es en C o es a temperatura ambiente, y la presión es en o cercana a la atmosférica.

## 55 Ejemplo 1: PsaA de *S. pneumoniae* y células epiteliales nasofaríngeas humanas - Evaluación de la interacción adhesina-receptor

**[0141]** Este ejemplo evalúa la capacidad de adherencia de esta proteína a células epiteliales nasofaríngeas (NP) humanas (Detroit 562). El epítipo funcional está localizado en una secuencia peptídica (aa 251-278 del número de acceso a GenBank gi|7920462|gb|AAF70667.1) incluyendo la hebra 7, la  $\alpha$ -hélice 8, y la hebra 8 de PsaA. Se encontró que esta secuencia peptídica (P4) se unía de forma eficaz a células Detroit 562 e inhibía ( $\geq 95\%$ ) la unión de la proteína PsaA.

60

Epítonos relevantes

**[0142]** Previamente, se identificaron tres péptidos (P1, P2 y P3) por presentación en fagos (Srivastava, et al. 2000; y solicitud de patente US 09/623038, incorporada en la presente memoria por referencia para el contenido de estos péptidos). Los anticuerpos contra los péptidos reducen la colonización en ratones inmunizados con los péptidos (Johnson, et al. 2002). Estos péptidos son funcionalmente reactivos pero no son idénticos a la secuencia de PsaA. sus secuencias de aminoácidos son las siguientes:

10 P1: T-V-S-R-V-P-W-T-A-W-A-F-H-G-Y  
 P2: R-S-Y-Q-H-D-L-R-A-Y-G-F-W-R-L  
 P3: L-V-R-R-F-V-H-R-R-P-H-V-E-S-Q

**[0143]** Se encontró que el péptido P1 contenía un epítipo funcional para la adherencia de PsaA a células NP (véase el Ejemplo 4).

**[0144]** El péptido P4 es un 96,1% similar a la secuencia de PsaA aunque contiene el epítipo funcional encontrado en P1. Esta variabilidad se debe a los dos restos DD de la secuencia no mutante que se cambiaron a KR en la secuencia de P4 para facilitar la unión a fluoroesferas. La SEC ID N 2 muestra estas dos sustituciones de aminoácidos y una diferencia adicional a partir de la SEC ID N 1.

20 P4: L-F-V-E-S-S-V-K-R-R-P-M-K-T-V-S-Q-D-T-N-I-P-Y-A-Q-I-F

Métodos:

**[0145]** Se evaluaron fluoroesferas modificadas con carboxilato (Molecular Probes™, 1 mm de diámetro) recubiertas con péptido sintético (P4) de PsaA recombinante (rPsaA) o PsaA para su adherencia a células NP Detroit 562. Se generaron cuatro lotes diferentes de perlas PsaA variando la concentración de la solución de proteína usada para recubrir las perlas (0,9 mg/ml, 0,53 mg/ml, 5,3 µg/ml y 0,53 µg/ml). Se generaron perlas de control de P4 y glicina usando una solución peptídica (0,9 mg/ml). Las concentraciones de proteínas se confirmaron por el ensayo de Bradford (Sigma). Las perlas de PsaA y péptidos se compararon en inóculos similares (1640 ± 210 perlas por pocillo) en ensayos de adherencia y de competición de adherencia (medidas como la media de las unidades fluorescentes (UF ± ET)).

Resultados:

35 Perlas recubiertas con rPsaA:

**[0146]** Las perlas PsaA de 0,9 mg/ml mostraron la mayor adherencia (47.875 UF ± 1385), seguido por el lote de 0,53 mg/ml de perlas PsaA (16.748 UF ± 205), y las perlas de PsaA de 5,3 µg/ml (12.788 UF ± 265). Las perlas PsaA de 0,53 µg/ml mostraron la menor adherencia (5.892 UF ± 316).

Perlas recubiertas con P4:

**[0147]** La adherencia fue de 19.340 UF ± 508; la adherencia de las perlas de control recubiertas con glicina fue de 2.799 UF ± 137. La competición de las perlas recubiertas con P4 con 5 µg, 10 µg y 20 µg de péptido P4 suspendido en solución produjo una reducción del 89%, 88% y 89% en las UF, respectivamente. La competición de las perlas recubiertas con PsaA con 5 µg, 10 µg y 20 µg de péptido P4 produjo una reducción del 23%, 68% y 95% en las UF.

**[0148]** En resumen, PsaA es una adhesina Pnc que se une a células epiteliales NP humanas. La adherencia de la perla PsaA es dependiente de la concentración de proteína PsaA. El péptido P4 contiene un epítipo funcional para la adherencia de PsaA. Proporcionado el epítipo funcional que media la adherencia bacteriana y un péptido aislado que comprende ese epítipo, se proporciona una vacuna mejorada contra neumococos. El péptido que contiene el epítipo también es útil para la medición específica e identificación de anticuerpos funcionales. Esto permite la producción de anticuerpos que tratan enfermedades por neumococos. El péptido de epítipo proporcionado es una base para un ensayo de diagnóstico de *S. pneumoniae*.

**Tabla 3. Inhibiciones competitivas**

Péptido P4 competidor (µg/pocillo)	Porcentaje de reducción en la adherencia de acuerdo con la perla diana	
	Recubierta con rPsaA (lote de 0,9 mg/ml)	Recubierta con P4
5,0	18,5	89,4
10	57,6	87,6
20	95,9	88,9

**[0149]** La Tabla 3 muestra el porcentaje de inhibición de la adherencia de perlas PsaA y perlas P4 en comparación con pocillos de control en ausencia de inhibidor (péptido P4). Todos los tipos de perlas se añadieron a la misma concentración a los pocillos de ensayo (~1.640 perlas en 20 µl de tampón).

**5 Ejemplo 2: Inmunización de conejos con péptidos multi-antigénicos (MAP) de P4**

**[0150]** Los MAP consisten en dos brazos, consistiendo cada uno en la SEC ID N° 1 unida mediante una lys o nle-lys a una resina.

10 Animales: Conejos hembra, edad 7 meses

**[0151]**

15 Programa de inmunización: Dosis - 1; Día 0  
Dosis - 2; Día 21  
Dosis - 3; Día 35

Dosificación: 5 a 25 µg por animal

20 Programa de exanguinación: 1) Exanguinación pre-inmunización; Día 0  
2) Exanguinación - 1 post inmunización; Día 28  
3) Exanguinación final (exanguinación - 2); Día 42

Evaluación de las muestras séricas:

25

**[0152]**

30 1) Inhibición de la adherencia de perlas fluorescentes recubiertas con P4 a células Detroit 562 (in vitro; cultivo tisular) para detectar la presencia de anticuerpos anti P4 en suero.

2) Inhibición de la adherencia de perlas fluorescentes recubiertas con PsaA a células Detroit 562 (in vitro; cultivo tisular) para detectar la presencia de anticuerpos anti PsaA en el suero.

35 3) Inhibición de la adherencia de neumococos (Pnc) a células Detroit 562 (in vitro; cultivo tisular) para detectar la presencia de anticuerpos anti Pnc en suero.

Inmunización con P4E - Análisis de sueros de conejo para anticuerpos anti P4 y anti neumococos (Pnc):

Animal 465

40

**[0153]**

**Tabla 4. Actividad anti P4 y anti Pnc en muestras séricas**

Dilución del suero	% de inhibición de la adherencia (% IA; Media de triplicados)					
	Actividad anti P4			Actividad anti neumococos		
	Pre-exanguinación	Exanguinación n° 1	Exanguinación n° 2	Pre-exanguinación*	Exanguinación n° 1	Exanguinación n° 2
1:10	0	39	43		5	0
1:100	0	32	8		25	4
1:1000	0	33	9		24	5
1:8000	0	6	5		23	13
1:16000	0	12	7		25	14
1:32000	0	5	9		5	14
1:64000	0	22	6		*	*
1:128000	0	10	5		*	*
1:256000	0	5	0		*	*
1:512000	0	5	6		*	*

Los valores de % IA que están encima de la variabilidad del ensayo (20%) se consideran para el análisis.

\* = No ensayado.



Animal 467

[0154]

**Tabla 5. Actividad anti P4 y anti Pnc en muestras séricas**

Dilución del suero	% de inhibición de la adherencia (% IA; media de triplicados)					
	Actividad anti P4			Actividad anti neumococos		
	Pre - exanguinación	Exanguinación n° 1	Exanguinación n° 2	Pre - exanguinación	Exanguinación n° 1	Exanguinación n° 2
1:10	0	46	48	0	38	21
1:100	0	29	28	8	55	21
1:1000	0	41	12	4	38	39
1:8000	0	9	4	6	34	21
1:16000	0	15	1	0	27	41
1:32000	0	17	5	*	22	16
1:64000	0	21	3	*	*	*
1:128000	0	15	9	*	*	*
1:256000	0	7	3	*	*	*
1:512000	0	7	3		*	*

Los valores de % IA que están encima de la variabilidad del ensayo (20%) se consideran para el análisis.  
\* = No ensayado.

5

Inmunización con P4E2 - Análisis de sueros de conejo para anticuerpos anti P4 y anti neumococos:

Animal 469

10 [0155]

**Tabla 6. Actividad anti P4 y anti Pnc en muestras séricas**

Dilución del suero	% de inhibición de la adherencia (% IA; media de triplicados)					
	Actividad anti P4			Actividad anti neumococos		
	Pre- exanguinación	Exanguinación n° 1	Exanguinación n° 2	Pre- exanguinación	Exanguinación n° 1	Exanguinación n° 2
1:10	0	50	74	0	5	17
1:100	0	0	0	0	21	30
1:1000	0	0	4	0	22	33
1:8000	0	0	1	0	19	22
1:16000	0	0	0	0	15	18
1:32000	0	0	0	0	0	1
1:64000	0	0	2	0	*	*
1:128000	0	0	4	0	*	*
1:256000	0	0	4	0	*	*
1:512000	0	0	0	0	*	*

Los valores de % IA que están encima de la variabilidad del ensayo (20%) se consideran para el análisis.  
\* = No ensayado.

Animal 471

[0156]

Tabla 7. Actividad anti P4 y anti Pnc en muestras séricas

Dilución del suero	% de inhibición de la adherencia (% IA; media de triplicados)					
	Actividad anti P4			Actividad anti neumococos		
	Pre-exanguinación	Exanguinación n° 1	Exanguinación n° 2	Pre-exanguinación*	Exanguinación n° 1	Exanguinación n° 2
1:10	0	56	75		38	3
1:100	0	0	3		3	0
1:1000	0	0	1		23	20
1:8000	0	0	2		21	16
1:16000	0	0	0		2	12
1:32000	0	0	0		0	23
1:64000	0	0	4		*	*
1:128000	0	0	0		*	*
1:256000	0	0	5		*	*
1:512000	0	0	0		*	*

Los valores de % IA que están encima de la variabilidad del ensayo (20%) se consideran para el análisis.  
\* = No ensayado.

5

Ejemplo 3: Inmunización de ratones con P4 y PsaA.

[0157]

Tabla 8. Suero de ratones - datos anti P4/PsaA

Suero	Actividad anti P4/PsaA (%IA de perlas P4/PsaA)					
	P4			PsaA		
Dilución	Pre	7° día	11° día	Pre	7° día	11° día
8	85	81	95	71	84	79
16	46	40	44	30	47	37
32	0	31	45	0	42	34
64	0	0	4	0	0	11
128	0	0	0	0	0	1
256	0	0	0	0	0	0
512	0	0	0	0	0	0
1024	0	0	0	0	0	0
2048	0	0	0	0	0	4
4096	0	0	0	0	0	18

10

[0158] Se detectó inhibición de adherencia de hasta un 45% en los sueros (dilución 1:32) de ratones inmunizados con péptido P4, mientras que no se detectó inhibición de adherencia en los sueros pre-inmunización.

15 **Ejemplo 4: Adherencia de partículas recubiertas con adhesina A de superficie de neumococos (PsaA) a células epiteliales nasofaríngeas humanas para la evaluación de anticuerpos funcionales anti-PsaA.**

Materiales y métodos

*Preparación de monocapas de células Detroit 562*

20

[0159] Se obtuvieron células epiteliales de carcinoma humano nasofaríngeo (células Detroit 562) de la American Type Culture Collection, Manassas, Va (CCL138, ATCC, Rockville, MD). Se sembraron cultivos madre a  $1 \times 10^5$  células/ml en frascos de cultivo tisular T-75 cm<sup>2</sup> (Corning Costar Co., Cambridge, MA). El medio de cultivo usado fue medio esencial mínimo con sales de Earle (EMEM), sin L-glutamina (Life Technologies, Grand Island, NY), y

suplementado con suero de ternera fetal al 10% (Hyclone, Logan, Utah). Las células se cultivaron a 37°C y en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 7 días. Las monocapas de ensayos de adherencia se sembraron con 200 µl/pocillo de una suspensión de 2X10<sup>5</sup> células/ml en placas tratadas con cultivo tisular de 96 pocillos (Corning Costar Co., Corning, NY) y se dejó que alcanzaran crecimiento confluyente durante 6 días como se ha descrito previamente (Romero-Steiner). Las monocapas (placas de 96 pocillos) pudieron usarse a los 6 ó 7 días sin afectar a la adherencia de las partículas recubiertas.

#### *Fuente de proteína PsaA y péptidos*

10 **[0160]** La PsaA recombinante purificada (múltiples lotes que varían de 1,8 a 2,8 mg/ml) fue amablemente donada por Aventis-Pasteur, Toronto, Ontario, Canadá. Además, se usaron tres péptidos sintéticos con secuencias identificadas por presentación en fagos (Srivastrava). Estas secuencias se usaron en estudios de inmunogenicidad y protección animal (**Johnson**). Estos péptidos son funcionalmente reactivos pero no idénticos a la secuencia de la proteína PsaA (Fig. 4). Las secuencias peptídicas fueron las siguientes: P 1 = T-V-S-R-V-P-W-T-A-W-A-F-H-G-Y (PM = 1.796,9 dalton), P2 = R-S-Y-Q-H-D-L-R-A-Y-G-F-W-R-L (PM = 1.512,6 dalton), y P3 = L-V-R-R-F-V-H-R-R-P-H-V-E-S-Q (PM = 1.916,2 dalton). Cada péptido se sintetizó en forma de péptido ramificado usando un enlazador de dos aminoácidos (lisina y nor-leucina) en el extremo carboxilo como se ha descrito anteriormente por Johnson et al. (**Johnson**). Se obtuvo un cuarto péptido (P4) por comparación de las secuencias peptídicas de P1 y P3 con PsaA. P4 no estaba ramificado y contenía la secuencia homóloga de aminoácidos de PsaA (PM = 3.254,8 dalton, restos aminoácídicos 251 a 278; L-F-V-E-S-S-V-K-R-R-P-M-K-T-V-S-Q-D-T-N- I-P-I-Y-A-Q-I-F), donde P1 y P3 estaban mapeados. Tanto rPsaA (PM 34.079 dalton) como los péptidos sintéticos no estaban lipidados. Los dos aminoácidos proporcionados en negrita son diferentes de la secuencia de PsaA dada en gi|7920462|gb|AAF70667.1, para generar un péptido con una carga positiva neta para la unión a las fluoesferas modificadas con carboxilato. Estas sustituciones conservativas se hicieron en una región de aminoácidos entre la hebra 7 y la hélice 8 de la proteína para minimizar cualquier efecto sobre los dominios funcionales (Fig. 4).

#### *Marcaje de fluoesferas modificadas con carboxilato con rPsaA o péptidos*

30 **[0161]** Se unió covalentemente la proteína PsaA recombinante o péptidos sintéticos a fluoesferas modificadas con carboxilato (Molecular Probes, Eugene, Oregón) (intervalo de 505/515 nm, amarillas, 1 µm de diámetro). Todos los péptidos tenían una carga neta positiva a pH 6,0, lo que facilitaba la unión a las fluoesferas modificadas con carboxilato. Se agitó con vórtice la solución madre de fluoesferas al 2% durante 2 minutos a toda velocidad. Se sometió a sonicación una alícuota de 250-µl durante 5 minutos para destruir las acumulaciones. Las fluoesferas sonicadas se lavaron 3 veces por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos en 250 µl de tampón MES, pH 6,0 (Molecular Probes). La carga negativa en las fluoesferas modificadas con carboxilatos se activó añadiendo 50 µl de solución EDAC (100 mg/ml, Molecular Probes) a las fluoesferas lavadas resuspendidas en 200 µl de MES. Las fluoesferas se incubaron durante 30 minutos a TA con rotación suave. Se añadió un volumen de 250 µl de rPsaA (1 mg/ml) o péptido (2 mg/ml) resuspendido en tampón MES a cada gránulo de fluoesfera. También se usaron concentraciones subóptimas de rPsaA (900, 530, 5,3 y 0,53 µg/ml) para generar fluoesferas parcialmente recubiertas. Los péptidos se disolvieron en forma de 1 mg en 50 µl de ácido acético al 10% seguido por adición de 450 µl de tampón MES, pH 6,0. La suspensión de 500-µl de fluoesferas se incubó en la oscuridad durante una noche a temperatura ambiente con rotación horizontal (150 rpm). Los sitios reactivos restantes se bloquearon mediante la adición de un volumen de 50-µl de solución 1 M de glicina, seguido por una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con rotación horizontal. La suspensión de fluoesferas después se lavó con 500 µl de PBS, 50 mM, pH 7,2-45 7,4 tres veces por centrifugación a 10.000 rpm durante 10 minutos. El primer sobrenadante del primer lavado se guardó para determinaciones de proteína usando el método de microdilución para microtitulación de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Calif.). El gránulo de fluoesfera marcado se resuspendió en 500 µl de PBS, 50 mM, pH 7,2-7,4. Las fluoesferas marcadas se almacenaron en la oscuridad en alícuotas de 100 µl a 4°C durante hasta 4 meses. Los péptidos se almacenaron en forma pulverizada a 4°C en desecante Dryerite. Los péptidos resuspendidos se almacenaron a 4°C durante 6 semanas y para almacenamiento a largo plazo a -70°C. Las fluoesferas se contaron por dilución limitante usando un fluorómetro (FLX-600, BioTek) con longitud de onda de excitación/emisión de 485/520 nm y comparación con una curva de calibrado previamente generada frente a recuentos de hemocitómetro.

#### *Adherencia de fluoesferas recubiertas con rPsaA o péptido a células Detroit 562*

55 **[0162]** Se lavaron monocapas confluyentes de células Detroit 562 cultivadas en placas de cultivo tisular de 96 pocillos durante 6 días una vez con 130 µl/pocillo de ampón PBS + BSA al 0,5% (Sigma n° cat A2153, Fracción V purificada por precipitación en alcohol). No se usó el perímetro externo completo de la placa de microtitulación para ensayos de adherencia debido al efecto borde y la ausencia de crecimiento confluyente en estos pocillos. Se añadió un volumen de 80-µl por pocillo de tampón PBS + BSA al 1% y 20 µl por pocillo de suspensión diluida de fluoesferas (para producir ~3100 ± 500 fluoesferas en un volumen de 20µl) a las monocapas lavadas. La suspensión diluida de fluoesferas se sometió a sonicación durante 3 minutos antes de su adición al centro de los pocillos. Los pocillos blancos (columna 11) no contenían fluoesferas. Los laterales de las placas después se golpetearon suavemente para la mezcla. Se permitió que la placa incubara durante 2 horas a 37°C, Co<sub>2</sub> al 5%. Después de la incubación, las 65 placas se lavaron 5 veces con 130 µl/pocillo de PBS + BSA al 0,5%. El líquido se retiró después de cada lavado con

un aspirador multicanal (Costar) y vacío moderado. Se permitió que la placa secase antes de la lectura en el fluorómetro (485/520 nm). El archivo se exportó a un formato de texto en una hoja de cálculo (Excel, Windows 2000) para calcular la adherencia media y el error típico (ET).

##### 5 *Inhibiciones competitivas*

**[0163]** Se realizaron inhibiciones competitivas homólogas con 0,5 a 10 µg por pocillo de proteína rPsaA o 5 a 20 µg por pocillo de cada péptido para determinar la especificidad de la adherencia de fluoesferas recubiertas con rPsaA o de cada una de las tres fluoesferas recubiertas con péptido. Se realizaron inhibiciones competitivas heterólogas con cada péptido (10 µg por pocillo) para determinar qué péptido bloqueaba la adherencia de fluoesferas recubiertas con PsaA completo a las células Detroit 562. La absorción de anticuerpos específicos para PsaA se realizó por incubación (2 horas a temperatura ambiente con rotación, 100 rpm) de 500 µl (dilución 1:8) del suero 7051 con tiras de nitrocelulosa (2,5 x 0,5 cm), previamente impregnadas con proteína rPsaA (1,8 mg/ml) y se dejaron secar a 37°C durante 1 hora. Las tiras se reemplazaron cada 2 horas para un total de 3 cambios. Todas las absorciones de anticuerpo se realizaron en PBS (10 mM, pH 7,2) suplementado con BSA al 1% (peso/volumen) como bloqueante no específico. Las concentraciones (µg/ml) de inmunoglobulina G (IgG) se midieron como se ha descrito previamente (**Tharpe, Romero-Steiner**) después de cada etapa de absorción para controlar la disminución de anticuerpos anti-PsaA.

##### 20 *Ensayos de inhibición de adherencia en suero*

**[0164]** Se realizaron ensayos de inhibición de adherencia en suero como se ha descrito previamente para la inhibición de la adherencia de neumococos (**Romero-Steiner**). Se encontraron dos soluciones tampón adecuadas para este tipo de ensayo: solución 1 (medio EMEM-solución salina tamponada de Hanks con Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup> suplementado con BSA al 0,2%) como se ha informado previamente (**Romero-Steiner**) o solución 2 (PBS 10 mM, pH 7,2-7,4 suplementado con BSA al 1% y BSA al 0,5% para los lavados) como se describe a continuación. El uso de una solución tampón en preferencia de la otra depende de la disponibilidad de BSA (Sigma n° cat A2153). Se evaluaron preparaciones alternativas de BSA pero no se encontraron adecuadas para este ensayo debido a la toxicidad a la monocapa celular. En resumen, se lavaron monocapas confluyentes de células Detroit 562 una vez con 130 µl/pocillo de tampón PBS + BSA al 0,5%. Se añadió un volumen de 45 µl de tampón PBS + BSA al 1% a cada pocillo y la placa se incubó mientras se preparaban diluciones séricas en una placa duplicada (Costar fondo en U). Las diluciones en suero en la placa duplicada podían realizarse en un esquema de dilución de factor 2 o factor 3. Para el esquema de dilución de factor 2, se añadía un volumen de 10 µl de suero de ensayo o control a la primera fila de pocillos (B2-B11) que ya contenían 70 µl de PBS + BSA al 1%. Se añadía un volumen de 40 µl de PBS + BSA al 1% al resto de los pocillos incluyendo el perímetro externo. Los sueros de la fila B se diluyeron en serie en las filas C-F con un equipo de pipeteo multicanal a 40 µl (factor 2). Los últimos 40 µl se desecharon en los residuos. No se añadió suero a los pocillos de control de adherencia (fila G o columna 11). Se añadió un volumen de 20 µl de la dilución óptima de fluoesferas (habitualmente 1:100 ó 1:150, que contenía ~3.100 fluoesferas) a cada pocillo, incluyendo controles sin suero. La suspensión de fluoesferas se sometió a sonicación durante 3 minutos antes de su adición al centro de los pocillos para generar una única suspensión de fluoesferas. La placa de microtitulación se mezcló por golpeteo de los laterales suavemente e incubando durante 15 minutos a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. Al final del periodo de incubación, se sembraron por duplicado 55 µl/pocillo en la placa de microtitulación que contenía las monocapas lavadas que contenían 45 µl de PBS + BSA al 1%. El volumen de pocillo final se ajustó siempre a un volumen de 100-µl independientemente del esquema de dilución con suero usado (factor 2 o factor 3) para controlar la reproducibilidad de la adherencia de las fluoesferas. La placa se mezcló por golpeteo de los laterales suavemente e incubando durante 2 horas a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. Después de la incubación, las placas se lavaron 5 veces con 130 µl/pocillo de PBS + BSA al 0,5%. Las placas se permitieron secar antes de la lectura en un fluorómetro (BioTek, FLX 800) a 485 nm para la excitación y emisión a 520 nm. El porcentaje de inhibición de adherencia (IA) se calculó en comparación con los controles de adherencia. Se usó la siguiente fórmula: %AI = 100-(UF de pocillo de ensayo x 100)/media de UF de los controles.

### Resultados

#### *Adherencia de fluoesferas recubiertas con rPsaA y péptido*

**[0165]** La adherencia relativa de fluoesferas recubiertas con rPsaA o péptido a células Detroit 562 se da en la Fig. 5. Las fluoesferas recubiertas con P1 mostraron la mayor adherencia a células NP con una media de UF ± ET de 52.684 ± 4.354, seguidas por fluoesferas recubiertas con rPsaA (UF medias = 44.195 ± 2.648), y fluoesferas recubiertas con P4 (UF medias = 20.317 + 448). Las fluoesferas recubiertas con P2 y P3 mostraron la mínima adherencia con UF medias = 17.195 ± 1.044 y 9.780 + 28, respectivamente. La cantidad de fluoesferas recubiertas usadas para realizar el ensayo fue directamente proporcional a la señal de UF observada después de un periodo de incubación de 2 horas. Cada lote de fluoesferas generado se ensayó a diferentes diluciones (habitualmente 1:50, 1:100 y 1:200) para confirmar la unión diferencial según se diluían las partículas recubiertas. Habitualmente, las fluoesferas recubiertas con rPsaA P1 y P4 a una dilución 1:50 dieron una señal rebosante (más de 100.000 UF). La mayoría de las partículas recubiertas se usaron a diluciones entre 1:100 y 1:200 para obtener una señal de 20.000 a

50.000 UF. Diluciones superiores a menudo provocaron señales de 10.000 UF o menos. La adherencia de fluoesferas recubiertas con rPsaA también fue dependiente de la cantidad de rPsaA usada para recubrir las fluoesferas (Fig. 6). La adherencia de fluoesferas rPsaA a la superficie de la monocapa se muestra en la Fig. 3. Esta adherencia aumentó con el tiempo de incubación. La señal de adherencia media (n = 6) para fluoesferas recubiertas con rPsaA (2600 fluoesferas/pocillo) fue de 2.315 UF después de una incubación de 20 minutos y aumentó de forma lineal hasta 17.498 UF después de una incubación de 180 minutos. La adherencia comenzó a estabilizarse después de una incubación de 140 minutos (16.597 UF). Las señales de fondo en los pocillos de monocapa sin fluoesferas añadidas fue de  $1.000 \pm 150$ . Los ensayos de adherencia se realizaron en presencia de BSA al 1% para bloquear la adherencia no específica a la monocapa. Los rendimientos de fluoesferas recubiertas varió ligeramente de un lote a otro con un intervalo entre  $1,3$  y  $1,8 \times 10^7$  fluoesferas/ml y una estimación de 0,5 pg de proteína PsaA por fluoesfera cuando se usaba la concentración óptima de rPsaA (1 mg/ml) para el recubrimiento. Las fluoesferas fueron capaces de adherirse durante hasta 2 meses después del marcaje sin diferencia en la capacidad de unión. Por ejemplo, las fluoesferas recubiertas con rPsaA (lote 6, dilución 1:100 produciendo 2.600 fluoesferas en un volumen de 20- $\mu$ l) tuvieron una adherencia media y un % de CV en el día 1 de 30.105 UF (18,5%) y en el día 60 la adherencia media fue de 30.595 UF (6%).

*Especificidad de la adherencia*

**[0166]** La Tabla 9 muestra la especificidad de adherencia de fluoesferas recubiertas con rPsaA o péptido a células Detroit 562 en condiciones de competición homóloga con múltiples concentraciones de rPsaA o péptidos añadidos. Aunque se añadieron concentraciones crecientes (0,5 a 10  $\mu$ g/pocillo) de rPsaA, fuimos incapaces de reducir significativamente la adherencia de fluoesferas rPsaA con la proteína recombinante completa. La adición de 10  $\mu$ g/pocillo (100  $\mu$ g/ml) de P1, P2, P3, o P4 a sus reacciones de adherencia homólogas de fluoesfera recubierta con péptido provocó una reducción del 60,9%, 20,5%, 5,2% y 87,6% en la adherencia, respectivamente. Concentraciones mayores de péptido P3 (20  $\mu$ g/pocillo) produjeron una reducción del 44,2% en la adherencia de P3. La adherencia de P2 pudo reducirse hasta un 43,1% con concentraciones inferiores de péptido P2 (5  $\mu$ g/pocillo). Competiciones heterólogas con cada uno de los cuatro péptidos (10  $\mu$ g/pocillo) P1, P2, P3 inhibieron un 88,1%, 62,2%, 75,2%, y 57,6% de la adherencia de fluoesferas rPsaA, respectivamente, como se muestra en la Fig. 7. La competición heteróloga con 20  $\mu$ g/pocillo de P4, produjo una inhibición del 95,9% de la adherencia de fluoesferas rPsaA. No hubo efecto aditivo en la reducción de la adherencia de PsaA por la adición de péptidos P1, P2 y P3 en la misma mezcla de reacción.

**Tabla 9 Porcentaje de reducción en la adherencia de fluoesferas recubiertas con rPsaA y péptido a células Detroit 562 después de inhibición competitiva homóloga con rPsaA o cada uno de los péptidos.**

Competidor homólogo ( $\mu$ g/pocillo) <sup>a</sup>	Recubiertas con rPsaA	Péptidos derivados de presentación en fagos			Homólogo
		Recubiertas con P1	Recubiertas con P2	Recubiertas con P3	Recubiertas con P4
0	0	0	0	0	0
0,5	-5,2	ND <sup>b</sup>	ND	ND	ND
1,0	9,8	ND	ND	ND	ND
2,0	17,0	ND	ND	ND	ND
5,0	13,7	50,2	43,1	-7,3	89,4
10	11,4	60,9	20,5	5,2	87,6
20	ND	34,1	0,8	44,2	88,9

<sup>a</sup> Las concentraciones de péptido variaron de 1,5 a  $10 \times 10^{-2}$  mM, mientras que las concentraciones de rPsaA variaron de 0,4 a  $27,9 \times 10^{-4}$  mM.

<sup>b</sup> ND = no determinado. Los porcentajes de inhibición dados fueron el resultado de cuatro experimentos diferentes realizados por duplicado por 3 operarios diferentes.

*Inhibición en suero de la adherencia*

**[0167]** Los porcentajes de inhibición de la adherencia (%IA) se determinaron para nueve sueros de adultos sanos normales para evaluar los anticuerpos funcionales contra cada uno de los péptidos y contra la proteína rPsaA. Se observó inhibición de la adherencia de fluoesferas diana a las células Detroit 562, si una muestra sérica contenía anticuerpos funcionales. Los porcentajes de inhibición de la adherencia a una dilución en suero de 1:8 para estos nueve sueros se dan en la Tabla 10. Como estos sueros eran de donantes adultos normales, la determinación de títulos convencionales como dilución con inhibición de al menos el 50% de la adherencia de fluoesferas recubiertas con PsaA produjo títulos muy similares para la mayoría de los sueros (intervalo de título = 8 a 32) con la excepción del suero 7083 (título = 128). El suero 7051 se adsorbió para retirar los anticuerpos anti-PsaA. Para todos los sueros, el porcentaje IA fue similar cuando se usaban fluoesferas recubiertas con rPsaA, P1 o P4 en los ensayos de adherencia. La inhibición de la adherencia para fluoesferas recubiertas con rPsaA se correlacionó en gran medida con las inhibiciones observadas para las fluoesferas recubiertas con P1 y P4 ( $r \geq 0,794$ ,  $P < 0,05$ ). No se observaron correlaciones significativas ( $r \leq 0,318$ ,  $P > 0,10$ ) para fluoesferas recubiertas con P2 y P3 cuando se comparaban con fluoesferas recubiertas con rPsaA. Estos resultados indican que el péptido P1 contiene epítotos tanto

inmunorreactivos como funcionales para rPsaA. El péptido P1 se localizó en la región entre el aminoácido 251 y 278 (secuencia del péptido P4) de la proteína de neumococos rPsaA.

**Tabla 10 Porcentaje de inhibición de la adherencia de fluoesferas recubiertas con rPsaA o péptidos por sueros humanos adultos.**

Suero	IgG <sup>a</sup>	Recubiertas con PsaA	Recubiertas con P1	Recubiertas con P2	Recubiertas con P3	Recubiertas con P4
7005 <sup>b</sup>	3,5	86,6	85,8	28,1	24,7	80,5
7051	19,4	97,0	69,7	22,6	7,1	56,0
7055	3,6	65,2	61,2	28,0	13,4	75,0
7059	2,2	63,7	46,5	55,6	22,5	63,5
7060	14,6	68,7	64,1	53,0	41,1	72,0
7072	3,0	80,3	75,7	28,2	24,7	66,0
7074	17,7	79,3	59,8	61,1	31,5	74,0
7083	565,2	89,6	72,0	31,7	24,1	86,0
7164	ND <sup>c</sup>	86,0	76,3	59,0	16,2	89,0

<sup>a</sup> Concentración de anticuerpo IgG anti-PsaA (µg/ml) medida por ELISA.

<sup>b</sup> Cada suero donante adulto se diluyó 2 veces para un total de 6 diluciones. El porcentaje de inhibición de la adherencia dado es para la dilución en suero 1:8. El porcentaje de inhibición de la adherencia dado es el promedio de al menos dos experimentos diferentes realizados por duplicado.

<sup>c</sup> ND = no determinado.

##### 5 Efecto de la adsorción parcial de anticuerpos anti-PsaA

**[0168]** Se adsorbió suero 7051 con 3 tiras de nitrocelulosa (2 horas, a temperatura ambiente) saturadas con proteína PsaA para retirar los anticuerpos contra PsaA (Fig. 8). Sin embargo, después de 3 adsorciones secuenciales se consiguió solamente una retirada parcial de los anticuerpos contra PsaA (concentración inicial de anticuerpo IgG anti-PsaA = 19,4 µg/ml, después de una adsorción de tira = 14,5 µg/ml y después de 3 adsorciones de tira = 3,4 µg/ml). Cuando el suero 7051 adsorbido se diluía 1:16, la inhibición de la adherencia de fluoesferas recubiertas con PsaA se revertía en un 72%. El suero 7051 adsorbido (dilución 1:16) inhibía la adherencia de fluoesferas recubiertas con rPsaA, P1, P2, P3 en un 59,2, 54,4, -6,9, y 10,8%, respectivamente. Solamente se controló la disminución en la concentración de IgG. Es posible que la presencia de otras clases de anticuerpo (especialmente IgA) puede tener un importante papel en la prevención de la unión de PsaA a nivel de la mucosa.

**[0169]** PsaA es un candidato de vacuna de proteína común actualmente en evaluación para su uso en combinación con otras proteínas de neumococos. Se necesita el desarrollo de ensayos in vitro específicos y reproducibles para la medición de anticuerpos funcionales contra PsaA. Aunque los neumococos tienen múltiples adhesinas, en este estudio se ha demostrado que PsaA es una adhesina de neumococos que une específicamente a células NP humanas. En este estudio, las fluoesferas recubiertas con PsaA mostraron elevada capacidad de unión a células Detroit 562 (Fig. 5 y 6). La medición de anticuerpos capaces de inhibir la adherencia de una única adhesina (PsaA) o péptidos relacionados reduce el potencial de inhibición de la adherencia por anticuerpos a otras adhesinas, como se ha informado previamente cuando se usan los neumococos vivos en estos ensayos (Romero-Steiner). Además, la adherencia de neumococos vivos es dependiente del fenotipo de opacidad de la cepa Pnc (**Anderson, Weisser**). Por lo tanto, se necesita un rendimiento y especificidad superiores en ensayos que evalúen los anticuerpos funcionales contra rPsaA en futuros estudios de inmunogenicidad a gran escala. El recubrimiento de fluoesferas fue bastante reproducible de un lote a otro y la semi-vida fue de aproximadamente 3 meses a 4°C protegidas de la luz.

**[0170]** En este estudio, los péptidos P1 y P4 inhibían la mayor parte de la adherencia de fluoesferas recubiertas con PsaA, lo que indica que estos péptidos contienen un epítipo o epítipos funcionales para la adherencia de PsaA a células nasofaríngeas (Fig. 4). La secuencia de P1 identificada por análisis de la biblioteca de presentación en fagos no es muy similar a la secuencia de PsaA y tiene el potencial de alineación con seis regiones diferentes en la secuencia de PsaA. nuestros estudios de adherencia con la rPsaA completa y sus péptidos permitió una mejor localización de la secuencia de P1 y la identificación de la secuencia del péptido P4.

**[0171]** Las inhibiciones competitivas de fluoesferas recubiertas con rPsaA con péptido P3 fueron bastante variables. Sin embargo, cuando se usaban fluoesferas no saturadas (530 µg/ml de rPsaA), el péptido P3 podía potenciar la unión de fluoesferas rPsaA (<2,5 veces, datos no mostrados). Este tipo de interacción bimodal está actualmente en investigación y puede indicar la posibilidad de un receptor inducible en la célula nasofaríngea que sea dependiente de la concentración de rPsaA. En este estudio, también demostramos que la adherencia global de PsaA es dependiente de la concentración de rPsaA usada para generar las fluoesferas recubiertas (Fig. 6).

**[0172]** Un hallazgo interesante fue la elevada adherencia de fluoesferas recubiertas con P1, que se adherían mejor a las células Detroit 562 que las fluoesferas recubiertas con rPsaA. Estos resultados podrían explicarse en términos de cantidad relativamente mayor de epítipo o epítipos de unión sobre la superficie de las fluoesferas

- recubiertas con P1 en comparación con las fluoesferas recubiertas con rPsaA. La adherencia de fluoesferas recubiertas con PsaA se inhibió mejor por adición de sus péptidos relacionados que la proteína purificada en solución. Experimentos de rastreo frío con esferas no fluorescentes recubiertas con proteína PsaA mostraron mayores porcentajes de inhibición (hasta un 31%) de la adherencia de fluoesferas recubiertas con PsaA. Estos resultados sugieren que la proteína PsaA tiene una afinidad muy elevada por uno o más receptores en las células NP. Es posible que se necesite uno o más epítomos conformacionales para bloquear la adherencia de la proteína completa. Esto indica la presencia de un epítomo o epítomos de unión conformacionales para la lipoproteína PsaA que actúa como adhesina in vivo. Los péptidos P1, P2 y P3 usados en esta investigación se obtuvieron de una biblioteca de presentación en fagos y tiene baja identidad de secuencia de aminoácidos con la rPsaA (**Srivastrava**).
- 10 Sin embargo, su capacidad funcional de proteger a los ratones contra la portación nasofaríngea de neumococos se ha presentado previamente (**Johnson**). La evaluación de los anticuerpos funcionales en sueros humanos adultos mostró que anticuerpos contra P1 y P4 (péptido homólogo) son más prevalentes, ya que estos péptidos tenían porcentajes mayores de inhibición de la adherencia que los péptidos P2 y P3. No todos los sueros tuvieron capacidad similar de inhibir la unión de las diversas fluoesferas recubiertas con péptido. Esta heterogeneidad en las poblaciones de anticuerpos de adultos normales indica el potencial de identificación de epítomos relevantes de PsaA y otras adhesinas de neumococos usando este tipo enfoque. También tiene potencial para el desarrollo de ensayos de diagnóstico muy necesarios para controlar una enfermedad no invasiva por neumococos (**Scott**).

- [0173]** En resumen, estos resultados indican que los péptidos P1 y P4 contienen epítomo o epítomos funcionales de PsaA que median la adhesión a células epiteliales nasofaríngeas. El uso de rPsaA, péptidos P1 o P4 para recubrir fluoesferas puede usarse para ensayos de inhibición de la adherencia. Las ventajas principales de este formato de ensayo son la detección de unidades fluorescentes usando un fluorómetro con elevadas proporciones de señal a ruido, así como una recogida más rápida de datos que la determinación de unidades formadoras de colonias que requieren incubación durante una noche de las placas de ensayo. Este tipo de ensayo de adherencia debe evaluarse adicionalmente usando sueros pre y post vacunación en estudios de inmunogenicidad de esta vacuna candidata. Una aplicación adicional es el uso de péptidos específicos en el diagnóstico de enfermedad por neumococos. Los péptidos específicos tienen menor probabilidad de reaccionar con anticuerpos de reactividad cruzada producidos por microorganismos relacionados encontrados en la flora normal de la nasofaringe. Está en curso una evaluación adicional de anticuerpos anti-PsaA generados en respuesta a colonización por Pnc y otitis media aguda. El presente ensayo puede usarse para establecer correlaciones de protección necesaria en la evaluación de este tipo de vacuna contra neumococos.

#### **Ejemplo 5: P4 activa fagocitos profesionales y no profesionales**

- 35 Protocolo de activación de P4:

- [0174]** Se centrifugaron suspensiones celulares de HL-60 (promielocitos) y RAW264.7 (monocitos), y células Detroit 562 (células epiteliales nasofaríngeas) a 1000 rpm - 10 minutos y el sedimento se resuspendió en 1 ml de tampón PBS. A esto, se añadió solución de P4 (1 mg/ml) a una concentración del 10% (v/v), se mezcló por inversión unas pocas veces y se incubó a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante 15 minutos (HL-60 y RAW) o 30 minutos (Detroit 562). Después de la incubación, las células se centrifugaron de nuevo y se analizó el sobrenadante para las citoquinas y el sedimento celular se lavó una vez en PBS, se fijó en glutaraldehído al 2% y se procesó para el análisis de microscopía electrónica de transmisión (MET). Se registraron cambios en la liberación de citoquinas en células tratadas en las cuales estaba regulada negativamente la liberación/producción de ciertas citoquinas tales como EGF, IL8, y estaba regulado positivamente FGFbásico. La MET y las fotomicrografías ópticas demuestran la activación fagocítica en células tratadas con extensión membranosa característica, citoplasma espumoso y granular, y vacuolas.

#### **Ejemplo 6: Función peptídica dual**

- 50 **[0175]** Aparte de la inmunogenicidad, el péptido P4 tiene otras dos actividades biológicas; 1) adherencia a células epiteliales nasofaríngeas (NP) y 2) activación de células con especial referencia a células profesionales y no profesionales (fagocíticas). La adherencia del péptido P4 a células NP se demostró con perlas fluorescentes recubiertas con péptido P4 con el ensayo de adherencia in vitro usando células Detroit 562. La propiedad de activación celular dependiente de dosis en el péptido P4 se demostró con exposición directa de diferentes líneas celulares tales como células NP Detroit 562, HL-60 (fagocitos), y RAW 24.5 (monocitos) a solución de P4 (ejemplo 5). Las micrografías electrónicas de transmisión y la potenciación en la adherencia bacteriana a células NP tratadas con P4 demuestran este efecto claramente.
- 60 **[0176]** Con 2 actividades celulares principales en un único péptido, la secuencia proteica de P4 se analizó con el motor de búsqueda NCBI BLAST. Las secuencias carboxilo terminales - QDTNIPYIAQI (SEC ID N° 16)- tenían homología de secuencia (valor E: >10) con la proteína reguladora de la transcripción del *Lactobacillus gasseri*, *Streptococcus* sp., *Enterococcus faecalis*, y *Bacillus lincheniformis*. La propiedad de activación y adherencia pueden separarse con el segmento del péptido en el extremo carboxilo que confiere la propiedad de activación y el resto del segmento para la adherencia. En base a esto se sintetizaron el péptido de 11 aminoácidos P6 con la secuencia -

QDTNIPIYAQI (SEC ID N° 16) y la parte restante P7 de la secuencia de P4, LFVESSVKRRPMKTVS (SEC ID N° 17) y se analizaron para la activación y/o adherencia a células NP por individual o juntos.

#### Ejemplo 7: Células estimuladas con P4 expresan FGFbásico y potencian el crecimiento de fibroblastos

5 [0177] Se usaron 2 líneas celulares de fibroblasto, LEC-5 y NEO. Estas células se cultivaron en placas de titulación de 96 pocillos hasta que llegaron a ser confluyentes (~6 días). A esto, se añadió el sobrenadante celular tratado con P4 que tenía una concentración mayor de FGFbásico a diferentes concentraciones y se controló el crecimiento de forma fluorométrica con la ayuda de un indicador metabólico fluorométrico. Se observó una  
10 potenciación del crecimiento para fibroblastos con la composición de tratamiento (sobrenadante).

#### Referencias

15 [0178]

1. Anderson, B., J. Dahmen, F. Torbjörn, H. Leffler, G. Magnusson, G. Noori, y C. Svanborg Eden. 1983. Identification of an active disaccharide unitofaglycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J. Exp. Med.* 158:559-570.
2. Anderson, B., B. Eriksson, E. Falsen, A. Fogh, L. Å. Hanson, O. Nylén, H. Peterson, y C. Svanborg Edén. 1981. Adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells in vitro: differences in adhesive capacity among strains isolated from subjects with otitis media, septicemia, or meningitis or from healthy carriers. *Infect. Immun.* 32:311-317.
3. Berry, A. M. y J. C. Paton. 1996. Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 64:5255-5262.
- 20 4. Black, S., H. Shinefield, B. Fireman, E. Lewis, P. Ray, J. Hansen, L. Elvin, K. Ensor, J. Hackell, G. Siber, F. Malinoski, D. Madore, I. Chang, R. Kohberger, W. Watson, R. Austrian, K. Edwards, y el northern California Kaiser Permanente vaccine study center group. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. 2000. *Pediatr. Infect Dis. J.* 19:187-195.
5. Briles, D. E., E. Ades, J. C. Paton, J. S. Sampson, G. M. Carlone, R. C. Huebner, A. Virolainen, E. Swiatlo, y  
30 K. Hollingshead. 2000. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 68:796-800.
6. Centers for Disease Control and Prevention. 2000. Preventing pneumococcal disease among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 49(Nº. RR-09): 1-38.
- 35 7. Coffey, T. J., M. C. Enright, M. Daniels, J. K. Morona, R. Morona, W. Hryniewicz, J. C. Paton, y B. G. Spratt. 1998. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 27:73-83.
8. Cundell, D. R., J. N. Weiser, J. Shen, A. Young, y E. I. Tuomanen. 1995. Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 63:757-761.
- 40 9. Dagan, R., R. Melamed, M. Muallem, L. Piglansky, D. Greengerg, O. Abramson, P. M. Mendelman, N. Bohidar, y P. Yagupsky. 1996. Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *J. Infect. Dis.* 174:1271-1278.
10. Dintilhac, A., G. Alloing, C. Granadel, y J-P, Claverys. 1997. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adcand PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol. Microbiol.* 25:727-739.
- 45 11. Johnson, S, Dykes, J K, Jue, D, Sampson, JS, Carlone, GM, Ades, EW. 2002. Inhibition of pneumococcal carriage in mice by subcutaneous immunization with peptides from the common surface protein Pneumococcal Surface Adhesin A. *J. Infect. Dis.* 185:489-96.
- 50 12. Johnston, J. W., L. E. Myers, M. M. Ochs, W. H. Benjamin, Jr., D. E. Briles, y S. K. Hollingshead. 2004. Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: surface accessibility and role in protection from superoxide. *Infect. Immun.* 72: 5858-5867.
13. Morrison, K. E., D. Lake, J. Crook, G. M. Carlone, E. Ades, R. Facklam, y J. S. Sampson. 2000. Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 38:434-437.
- 55 14. Obaro, S. K., R. A. Adegbola, W. A. S. Banya, B. M. Greenwood. 1996. Carriage of pneumococci after pneumococcal vaccination. *Lancet* 348:271-272.
15. Ogunniyi, A. D., R. L. Folland, D. E. Briles, S. K. Hollingshead, y J. C. Paton. 2000. Immunization of mice with combination of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 68:3028-3033.
- 60 16. Pelton, S. I. M. Figueira, R. Albut, y J. Reino. 2000. Natural history of experimental otitis media due to PspA, PsaA or CbpA deficient mutants, abstr. 038. In Program and Abstracts of the Second International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases 2000. SmithKline Beecham Pharmaceuticals.
17. Rapola, S., V. Jantti, R. Haikala, R. Syrjanen, G. M. Carlone, J. S. Sampson, D. E. Briles, J. C. Paton, A. K. Takala, T. M. Kilpi, y H. Käyhty. 2000. Natural development of antibodies to pneumococcal surface protein A,



pneumococcal surface adhesin A, and pneumolysin in relation to pneumococcal carriage and acute otitis media. J. Infect. Dis. 182:1146-1152.

- 5 **18.** Romero-Steiner, S, Pilišvili, T, Sampson J, Johnson S, Stinson, A, Carlone, G, Ades E. 2001. Inhibition of Pneumococcal Adherence to Human Nasopharyngeal Epithelial Cells by Anti-Psa Antibodies. Clin. Diagn. Lab. Immunology. 10:246-251.
- 19.** Sampson, J. S., S. P. O'Connor, A. R. Stinson, J. A. Tharpe, y H. Russell. 1994. Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus* sp. adhesins. Infect. Immun. 62:319-324.
- 10 **20.** Seo, J-Y., S. Y. Seong, B-Y. Ahn, I. C. Kwon, H. Chung, y S. Y. Jeong. 2002. Cross-protective immunity of mice induced by oral immunization with pneumococcal surface adhesin A encapsulated in microspheres. Infect. Immun. 70:1143-1149.
- 21.** Srivastava, N., J.L. Zeiler, S.L. Smithson, et al. 2000. Selection of an immunogenic and protective epitope of the PsaA protein of *Streptococcus pneumoniae* using phage display library. Hybridoma. 19:23-31.
- 15 **21.** Tharpe, J. A., H. Russell, M. Leinonen, B.D. Plikaytis, R. F. Breiman, G. M. Carlone, E. W. Ades, y J. S. Sampson. 1998. Comparison of a pneumococcal common protein (PsaA) antibody ELISA and a PsaA immune complex ELISA. for detection of pneumococcal serum antibody. Pathobiology. 66:77-83.
- 22.** Weiser, J. N., E. I. Tuomanen, D. R. Cundell, P.K. Sreenivasan, R. Austrian, y H. R. Masure. 1994. The effect of colony opacity variation on pneumococcal colonization and adhesion. J. Cell. Biochem. 18A:S55.
- 20 **23.** Weiser, J. N., Z. Markiewicz, E. I. Tuomanen, y J. H. Wani. 1996. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 64:2240-2245.

**[0179]** Será evidente para los expertos en la materia que pueden hacerse diversas modificaciones y variaciones. Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la consideración de la memoria y la práctica de la invención descrita en la presente memoria.

25

LISTA DE SECUENCIAS

**[0180]**

30 <110> THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION  
Ades, Edwin W. Sampson, Jacquelyn S. Carlone, George M. Steiner, Sandra Rajam, Gowrisanker Caba, Joseph J.

35 <120> EPÍTOPOS FUNCIONALES DEL ANTÍGENO PSAA DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 14114.0380P1

<140> Sin asignar

40 <141> 29-07-2005

<150> 60/682.495

<151> 19-05-2005

45 <160> 17

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

50 <211>28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

<400> 1

Leu	Phe	Val	Glu	Ser	Ser	Val	Lys	Arg	Arg	Pro	Met	Lys	Thr	Val	Ser
1				5					10					15	
Gln	Asp	Thr	Asn	Ile	Pro	Ile	Tyr	Ala	Gln	Ile	Phe				
			20					25							

60

ES 2 431 315 T3

<210>2  
 <211>36  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

<400> 2  
 10

```

Val Pro Ser Leu Phe Val Asp Ser Ser Val Asp Asp Arg Pro Met Lys
 1           5           10           15
Thr Val Ser Gln Asp Thr Asn Ile Pro Ile Tyr Ala Gln Ile Phe Thr
      20           25           30
Asp Ser Ile Ala
      35
  
```

<210>3  
 <211> 15  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

20 <400> 3

```

Thr Val Ser Arg Val Pro Trp Thr Ala Trp Ala Phe His Gly Tyr
 1           5           10           15
  
```

25 <210>4  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

<400> 4

```

Arg Ser Tyr Gln His Asp Leu Arg Ala Tyr Gly Phe Trp Arg Leu
 1           5           10           15
  
```

<210>5  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

45 <400> 5

```

Leu Val Arg Arg Phe Val His Arg Arg Pro His Val Glu Ser Gln
 1           5           10           15
  
```

<210>6  
 50 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 431 315 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

<220>

5 <221> VARIANTE

<222> 1-3

<223> Xaa en la posición 1 = H, V, I o L Xaa en la posición 2 = H, P o G Xaa en la posición 3 = H, S o T

<220>

10 <221> VARIANTE

<222> 32-34

<223> Xaa en la posición 32 = H, T o S Xaa en la posición 33 = H o D Xaa en la posición 34 = H, S o T

15 <400> 6

Xaa	Xaa	Xaa	Leu	Phe	Val	Glu	Ser	Ser	Val	Lys	Arg	Arg	Pro	Met	Lys
1				5					10					15	
Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Thr	Asn	Ile	Pro	Ile	Tyr	Ala	Gln	Ile	Phe	Xaa
			20					25					30		
Xaa	Xaa														

<210>7

20 <211>28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

<400> 7

Leu	Phe	Val	Glu	Ser	Ser	Val	Asp	Asp	Arg	Pro	Met	Lys	Thr	Val	Ser
1				5					10					15	
Lys	Asp	Thr	Asn	Ile	Pro	Ile	Tyr	Ala	Lys	Ile	Phe				
			20					25							

30

<210>8

<211>28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

<400> 8

40

Leu	Phe	Val	Glu	Ser	Ser	Val	Asp	Asp	Arg	Pro	Met	Lys	Thr	Val	Ser
1				5					10					15	
Lys	Asp	Thr	Asn	Ile	Pro	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ile	Phe				
			20					25							

<210>9

<211>28

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

50

<400> 9

ES 2 431 315 T3

```

Leu Phe Val Glu Ser Ser Val Asp Asp Arg Pro Met Lys Thr Val Ser
 1           5           10           15
Lys Asp Thr Asn Ile Pro Ile His Ala Lys Ile Phe
           20           25
    
```

<210> 10

<211> 28

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

10

<400> 10

```

Leu Phe Val Glu Ser Ser Val Asp Asp Arg Pro Met Glu Thr Val Ser
 1           5           10           15
Lys Asp Ser Gly Ile Pro Ile Tyr Ala Glu Ile Phe
           20           25
    
```

15 <210> 11

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

<400> 11

```

Leu Phe Val Glu Ser Ser Val Asp Arg Arg Pro Met Glu Thr Val Ser
 1           5           10           15
Lys Asp Ser Gly Ile Pro Ile Tyr Ser Glu Ile Phe
           20           25
    
```

25

<210> 12

<211> 28

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

35 <400> 12

```

Leu Phe Val Glu Ser Ser Val Asp Lys Arg Pro Met Lys Ser Val Ser
 1           5           10           15
Arg Glu Ser Gly Ile Pro Ile Tyr Ala Glu Ile Phe
           20           25
    
```

<210> 13

40 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

<400> 13

ES 2 431 315 T3

Leu Phe Val Glu Ser Ser Val Asp Asp Arg Pro Met Lys Thr Ile Ser  
 1 5 10 15  
 Lys Glu Thr Gly Ile Ser Ile Tyr Ser Lys Ile Phe  
 20 25

<210> 14

<211> 28

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

10

<400> 14

Leu Phe Val Glu Thr Ser Val Asp Arg Arg Ser Met Glu Thr Val Ser  
 1 5 10 15  
 Lys Glu Thr Asn Val Pro Ile Ala Gly Thr Ile Phe  
 20 25

15 <210> 15

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

<400> 15

Leu Phe Val Glu Thr Ser Val Asp Pro Arg Ser Met Glu Ser Val Ser  
 1 5 10 15  
 Lys Glu Thr Gly Val Pro Ile Phe Ala Lys Ile Phe  
 20 25

25

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

35 <400> 16

Gln Asp Thr Asn Ile Pro Ile Tyr Ala Gln Ile  
 1 5 10

<210> 17

40 <211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial; nota = construcción sintética

<400> 17

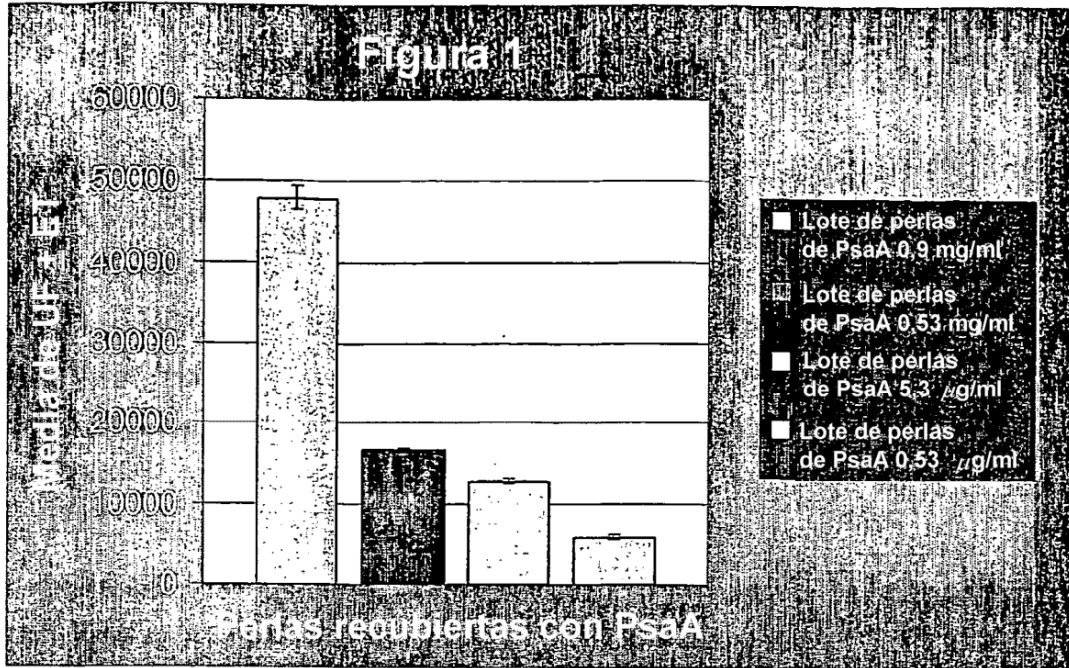
Leu Phe Val Glu Ser Ser Val Lys Arg Arg Pro Met Lys Thr Val Ser  
 1 5 10 15

50

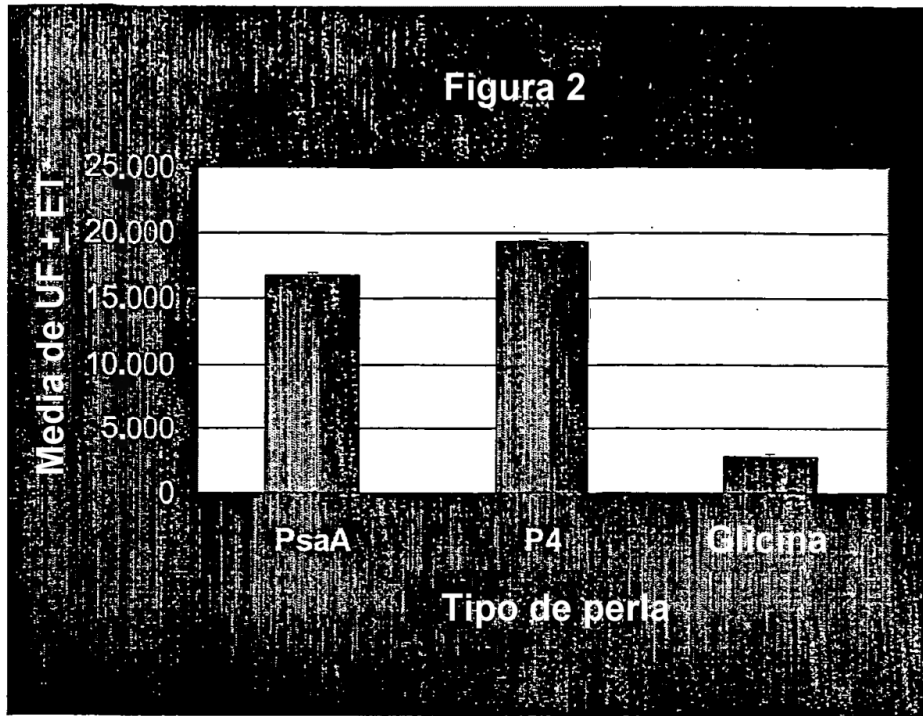
**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos definida en la SEC ID N° 1.
- 5 2. El péptido de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones neumocócicas inhibiendo la unión de la proteína adhesina A de superficie neumocócica (PsaA) y/o Streptococcus pneumoniae a células que expresan un receptor de PsaA.
3. El péptido de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones neumocócicas inhibiendo la unión de un Streptococcus pneumoniae transparente a una célula y/o potenciando la unión o internalización del fenotipo opaco.
- 10 4. El péptido de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento y/o prevención de infecciones neumocócicas potenciando la internalización de Streptococcus pneumoniae por células de la nasofaringe.
- 15 5. El péptido de la reivindicación 1 para su uso en el aumento del desarrollo de células neurales y la curación de heridas aumentando la expresión de FGFbásico por una célula.
6. El péptido de la reivindicación 1 para su uso en la reversión o retardo de metástasis tumoral disminuyendo la expresión por parte de una célula de una o más citoquinas seleccionadas entre el grupo que consiste en IL-8, IL-16 y EGF.
- 20 7. Un método de cribado in vitro para identificar un anticuerpo que bloquea la unión de una proteína adhesina A de superficie neumocócica (PsaA) a una célula, que comprende:
  - 25 a. poner en contacto la célula con el péptido de la reivindicación 1 en presencia o ausencia del anticuerpo inhibidor putativo; y
  - b. determinar la cantidad de unión de péptido a la célula en presencia y ausencia del anticuerpo inhibidor putativo, mediante lo cual una cantidad reducida de unión del péptido en presencia del anticuerpo en comparación con la cantidad de unión en ausencia del anticuerpo identifica el anticuerpo como un anticuerpo que bloquea la unión de la proteína adhesina A de superficie neumocócica (PsaA) a células epiteliales.
- 30 8. El método de cribado in vitro de la reivindicación 7, en el cual la PsaA es una célula bacteriana.
- 35 9. El método de cribado in vitro de la reivindicación 7, en el cual la PsaA está purificada.
10. Un método de cribado in vitro para identificar un anticuerpo que bloquea la unión de Streptococcus pneumoniae a una célula, que comprende:
  - 40 a. poner en contacto la célula con el péptido de la reivindicación 1 en presencia o ausencia del anticuerpo inhibidor putativo; y
  - b. determinar la cantidad de unión de péptido a la célula en presencia y ausencia del anticuerpo inhibidor putativo, mediante lo cual una cantidad reducida de unión del péptido en presencia del anticuerpo en comparación con la cantidad de unión en ausencia del anticuerpo identifica el anticuerpo como un anticuerpo que bloquea la unión de Streptococcus pneumoniae a células epiteliales.
- 45 11. Una vacuna que comprende el péptido de la reivindicación 1 y un portador farmacéutico.
12. El péptido de la reivindicación 1 para su uso en la inhibición de la unión de la proteína adhesina A de superficie neumocócica (PsaA) a células que expresan un receptor de PsaA.
- 50 13. El uso del péptido de la reivindicación 1 para preparar un medicamento destinado al tratamiento y/o prevención de infecciones neumocócicas inhibiendo la unión de la proteína adhesina A de superficie neumocócica (PsaA) a células que expresan un receptor de PsaA.
- 55 14. El uso del péptido de la reivindicación 1 para preparar un medicamento destinado al tratamiento y/o prevención de infecciones neumocócicas inhibiendo la unión de un Streptococcus pneumoniae transparente a una célula y/o potenciando la unión o internalización del fenotipo opaco.
- 60 15. El uso del péptido de la reivindicación 1 para preparar un medicamento destinado al tratamiento y/o prevención de infecciones neumocócicas potenciando la internalización de Streptococcus pneumoniae en células de la nasofaringe.
16. El uso del péptido de la reivindicación 1 para preparar un medicamento para aumentar el desarrollo de células neurales y la curación de heridas aumentando la expresión de FGFbásico por una célula.
- 65

17. El uso del péptido de la reivindicación 1 para preparar un medicamento para revertir o retardar la metástasis tumoral disminuyendo la expresión por parte de una célula de una o más citoquinas seleccionadas entre el grupo que consiste en IL-8, IL-16 y EGF.

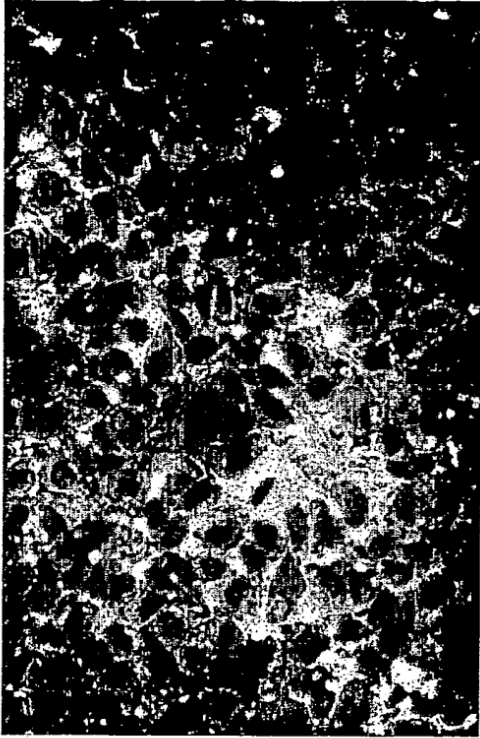






# Figura 3

A



B

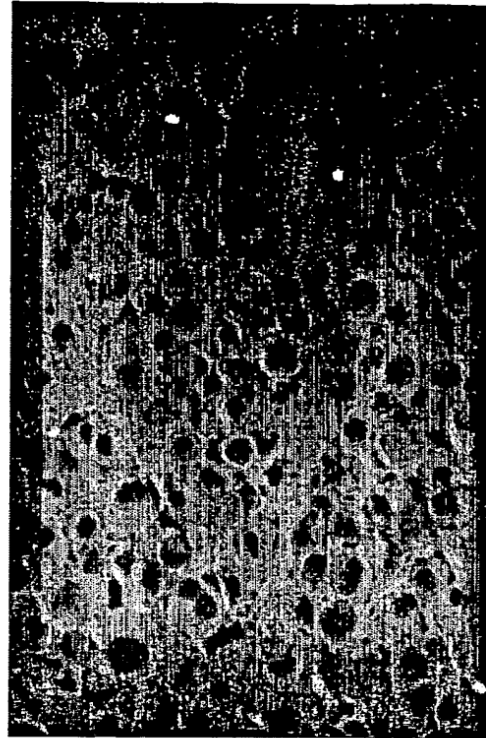


Figura 4

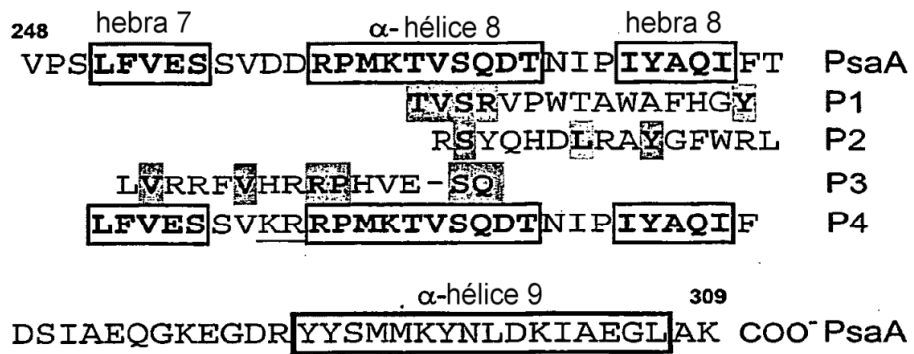


Figura 5

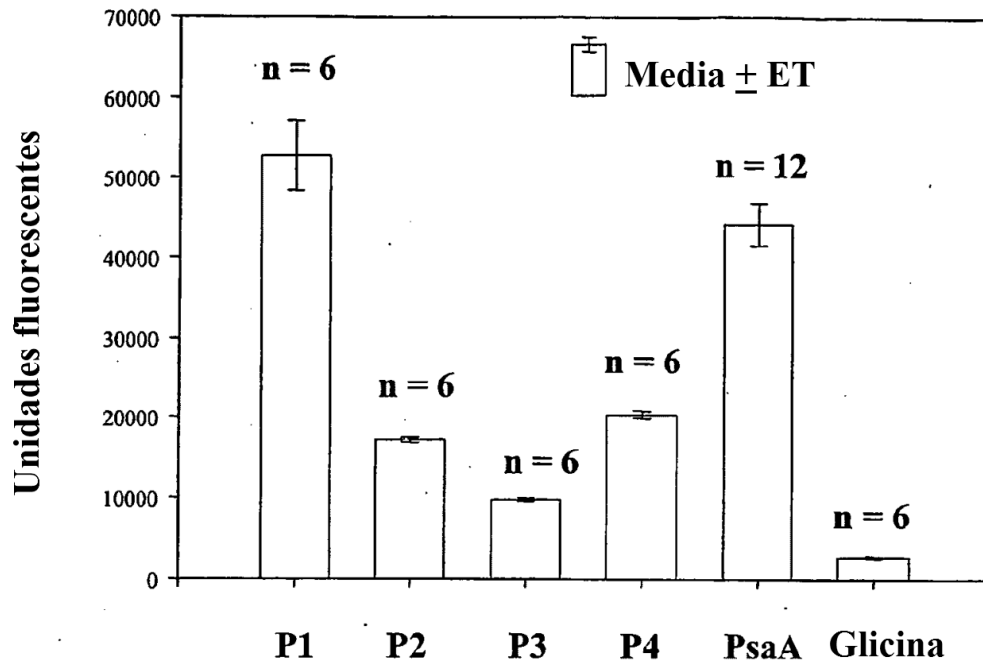


Figura 6

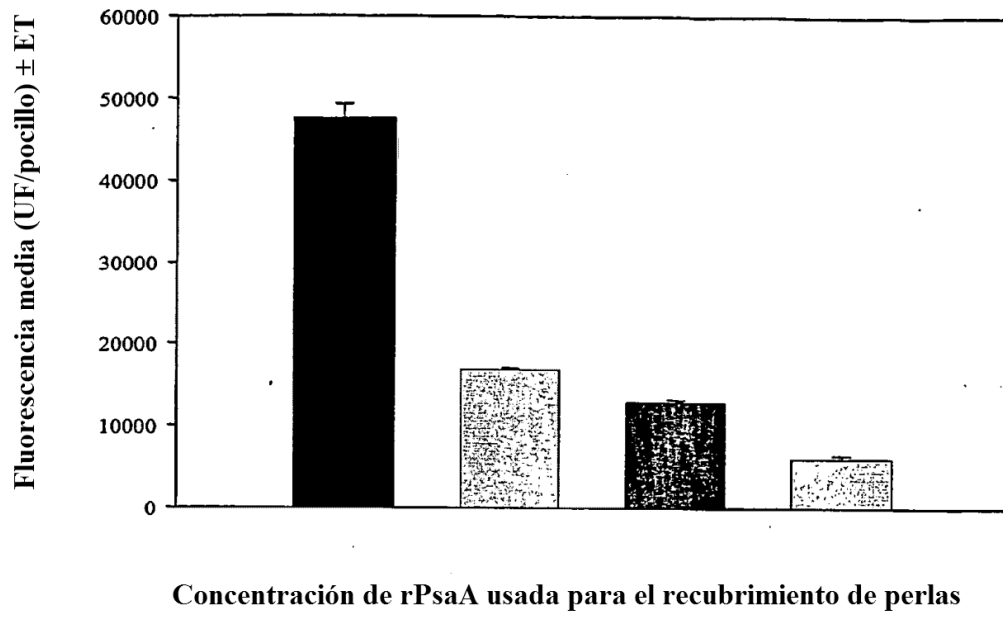


Figura 7

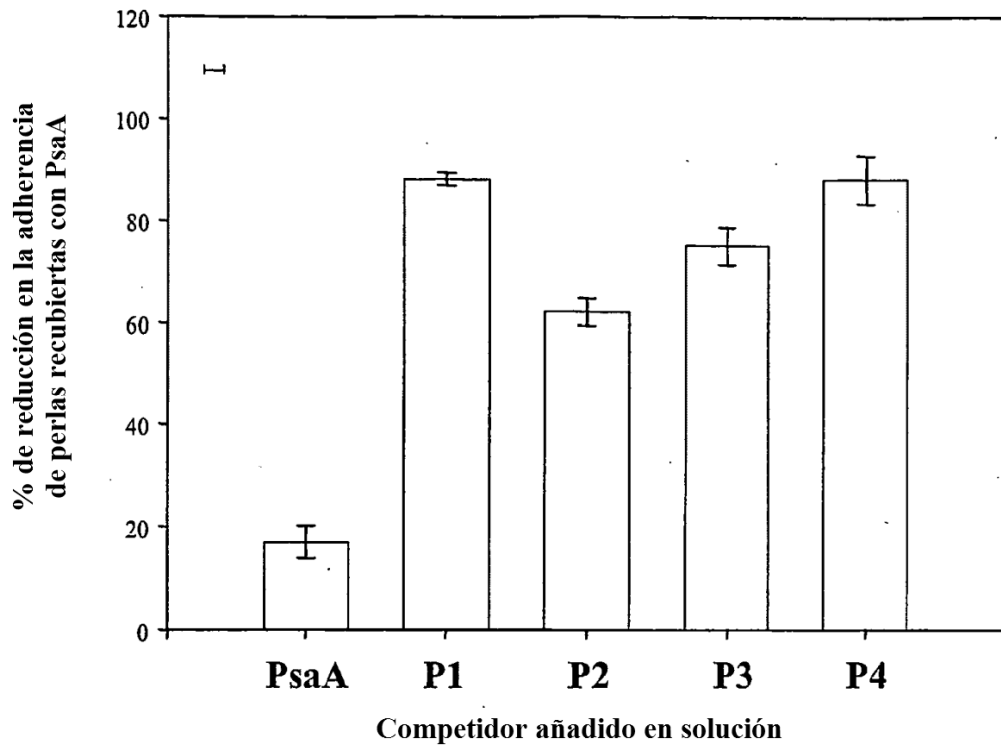
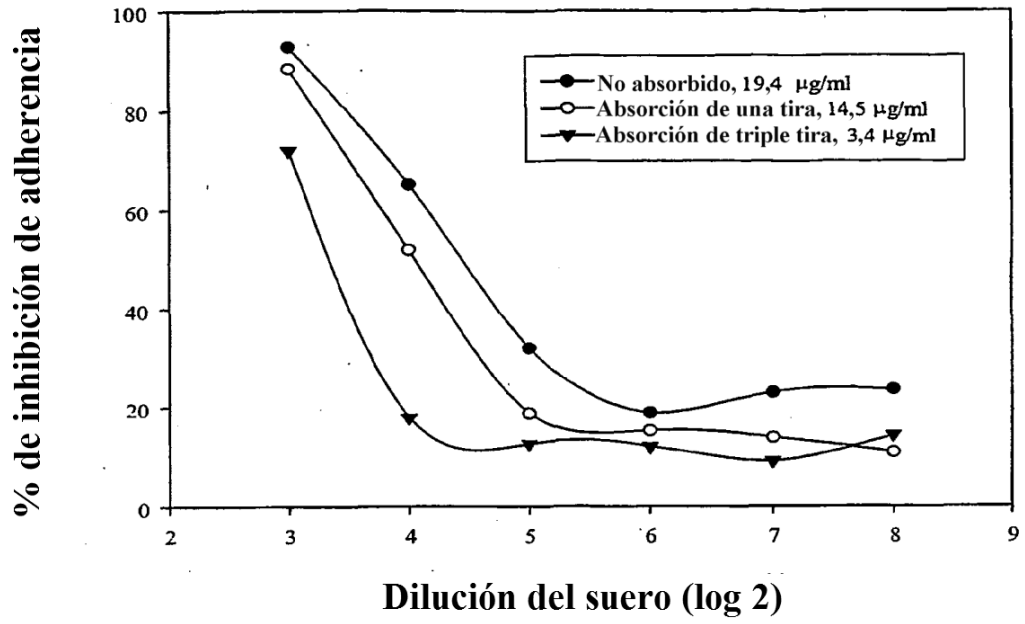


Figura 8



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

**Documentos de patentes citados en la descripción**

- 10 • EP 45665 A [0025]
- US 6358922 B [0026]
- US 613092 A [0028]
- 15 • US 4816567 A [0037] [0043] [0058]
- US 4704692 A [0046]
- US 4946778 A [0051]
- US 5359046 A [0052]
- WO 9429348 A [0053]
- 20 • US 4342566 A [0053]
- US 5565332 A, Hoogenboom [0058] [0124]
- US 5721367 A, Kay [0058]
- US 5837243 A, Deo [0058]
- 25 • US 5939598 A, Kucherlapati [0058]
- US 6130364 A, Jakobovits [0058]
- US 6180377 B, Morgan [0058]
- US 3610795 A [0101]
- 30 • US 5084824 A [0124]
- US 5288514 A [0124] [0125]
- US 5449754 A [0124]
- US 5506337 A [0124] [0125]
- 35 • US 5539083 A [0124]
- US 5545568 A [0124]
- US 5556762 A [0124]
- US 5565324 A [0124]
- US 5573905 A [0124]
- 40 • US 5618825 A [0124] [0125]
- US 5619680 A [0124]
- US 5627210 A [0124]
- US 5646285 A [0124]
- 45 • US 5663046 A [0124]
- US 5670326 A [0124]
- US 5677195 A [0124]
- US 5683899 A [0124]
- 50 • US 5688696 A [0124]
- US 5688997 A [0124]
- US 5698685 A [0124] [0125]
- US 5712146 A [0124] [0125]
- US 5721099 A [0124] [0125]
- 55 • US 5723598 A [0124]
- US 5741713 A [0124]
- US 5792431 A [0124]
- US 5807683 A [0124]
- 60 • US 5807754 A [0124]
- US 5821130 A [0124] [0125]
- US 5831014 A [0124] [0125]
- US 5834195 A [0124]
- US 5834318 A [0124]
- US 5834588 A [0124]
- US 5840500 A [0124] [0125]
- US 5847150 A [0124] [0125]
- US 5856107 A [0124] [0125]
- US 5856496 A [0124] [0125]
- US 5859190 A [0124] [0125]
- US 5864010 A [0124]
- US 5874443 A [0124]
- US 5877214 A [0124]
- US 5880972 A [0124]
- US 5886126 A [0124]
- US 5886127 A [0124]
- US 5891737 A [0124]
- US 5916899 A [0124] [0125]
- US 5919955 A [0124] [0125]
- US 5925527 A [0124] [0125]
- US 5939268 A [0124]
- US 5942387 A [0124] [0125]
- US 5945070 A [0124]
- US 5948696 A [0124] [0125]
- US 5958702 A [0124]
- US 5958792 A [0124] [0125]
- US 5962337 A [0124] [0125]
- US 5965719 A [0124] [0125]
- US 5972719 A [0124] [0125]
- US 5976894 A [0124] [0125]
- US 5980704 A [0124]
- US 5985356 A [0124]
- US 5999086 A [0124]
- US 6001579 A [0124]
- US 6004617 A [0124]
- US 6008321 A [0124]
- US 6017768 A [0124] [0125]
- US 6025371 A [0124] [0125]
- US 6030917 A [0124]
- US 6040193 A [0124]
- US 6045671 A [0124]
- US 6045755 A [0124]
- US 6060596 A [0124]
- US 6061636 A [0124]
- US 09623038 B [0142]
- US 60682495 B [0180]



## Literatura diferente de patentes citadas en la descripción

- 5 • **BEN-BASSAT et al.** *J. Bacteriol.*, 1987, vol. 169, 751-7 [0023]
- **O'REGAN et al.** *Gene*, 1989, vol. 77, 237-51 [0023]
- **SAHIN-TOTH et al.** *Protein Sci.*, 1994, vol. 3, 240-7 [0023]
- 10 • **HOCHULI et al.** *Biol/Technology*, 1988, vol. 6, 1321-5 [0023]
- **THORSON et al.** *Methods in Molec. Biol.*, 1991, vol. 77, 43-73 [0024]
- 15 • **ZOLLER.** *Current Opinion in Biotechnology*, 1992, vol. 3, 348-354 [0024]
- **IBBA.** *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 1995, vol. 13, 197-216 [0024]
- **CAHILL et al.** *TIBS*, 1989, vol. 14 (10), 400-403 [0024]
- 20 • **BENNER.** *TIB Tech*, 1994, vol. 12, 158-163 [0024]
- **IBBA ; HENNECKE.** *Biol/technology*, 1994, vol. 12, 678-682 [0024]
- 25 • **SPATOLA, A. F.** *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins.* Marcel Dekker, 1983, 267 [0025]
- **SPATOLA, A. F.** *Vega Data. Peptide Backbone Modifications*, March 1983, vol. 1 (3 [0025]
- 30 • **MORLEY.** *Trends Pharm Sci*, 1980, 463-468 [0025]
- **HUDSON, D. et al.** *Int J Pept Prot Res*, 1979, vol. 14, 177-185 [0025]
- **SPATOLA et al.** *Life Sci*, 1986, vol. 38, 1243-1249 [0025]
- 35 • **HANN.** *J. Chem. Soc Perkin Trans.*, 1982, vol. I, 307-314 [0025]
- **ALMQUIST et al.** *J. Med. Chem.*, 1980, vol. 23, 1392-1398 [0025]
- 40 • **JENNINGS-WHITE et al.** *Tetrahedron Lett*, 1982, vol. 23, 2533 [0025]
- **CHEMICAL ABSTRACTS**, 97:39405 [0025]
- **HOLLADAY et al.** *Tetrahedron. Lett*, 1983, vol. 24, 4401-4404 [0025]
- 45 • **HRUBY.** *Life Sci*, 1982, vol. 31, 189-199 [0025]
- **RIZO ; GIERASCH.** *Ann. Rev. Biochem.*, 1992, vol. 61, 387 [0027]
- **JOHNSON et al.** *The Journal of Infectious Diseases*, 2002, vol. 185, 489-96 [0028]
- 50 • **KABAT E. A. et al.** *Sequences of Proteins of Immunological Interest.* National Institutes of Health, 1987 [0036]
- **MORRISON et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0037]
- 55 • **KOHLER ; MILSTEIN.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0038]
- **HARLOW ; LANE.** *Antibodies, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Publications, 1988 [0038] [0040] [0045] [0053] [0110]
- 60 • **KILPATRICK KE et al.** *Gene gun delivered DNA-based immunizations mediate rapid production of murine monoclonal antibodies to the Flt-3 receptor.* *Hybridoma*, December 1998, vol. 17 (6), 569-76 [0038]
- **KILPATRICK KE et al.** *High-affinity monoclonal antibodies to PED/PEA-15 generated using 5 micrograms of DNA.* *Hybridoma*, August 2000, vol. 19 (4), 297-302 [0038]
- **GODING.** *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice.* Academic Press, 1986, 59-103 [0040]
- **KOZBOR.** *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0040]
- **BRODEUR et al.** *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications.* Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0040]
- **JAKOBOVITS et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551-255 [0044]
- **JAKOBOVITS et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0044]
- **BRUGGEMANN et al.** *Year in Immuno.*, 1993, vol. 7, 33 [0044]
- **HOOGENBOOM et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0044]
- **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0044]
- **COLE et al.** *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy.* Alan R. Liss, 1985, 77 [0044]
- **BOERNER et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0044]
- **SCHNOLZER, M et al.** *Science*, 1992, vol. 256, 221 [0048]
- **DELISLE MILTON RC et al.** *Techniques in Protein Chemistry IV.* Academic Press, 1992, 257-267 [0048]
- *New England Biolabs Product Catalog.* 1996, 164 [0049]
- **ZOLLER MJ et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1982, vol. 10, 6487-500 [0050]
- **HUSE et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1275-1281 [0051]
- **HUSTON, J. S. et al.** *Methods in Enzym.*, 1991, vol. 203, 46-121 [0052]
- **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0057] [0058]
- **REICHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0057]
- **PRESTA.** *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0057]
- **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0058]
- **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0058]
- *Remington: The Science and practice of Pharmacy.* Mack Publishing Company, 1995 [0067]
- *Synthetic Vaccines.* CRC Press, Inc, 1987, vol. I, 83-92 [0073]
- *Handbook of Monoclonal Antibodies.* Nokes Publications, 1985, 303-357 [0105]
- 65

- **SMITH et al.** Antibodies in Human Diagnosis and Therapy. Raven Press, 1977, 365-389 [0105]
- 5 • **MUNSON et al.** *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0110]
- **ROTIVINEN et al.** *Acta Pharmaceutica Fennica*, 1988, vol. 97, 159-166 [0117]
- **RIPKA.** *New Scientist*, 16 June 1988, 54-57 [0117]
- 10 • **MCKINALY ; ROSSMANN.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1989, vol. 29, 111-122 [0117]
- **PERRY ; DAVIES.** QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design. Alan R. Liss, Inc, 1989, 189-193 [0117]
- 15 • **LEWIS ; DEAN.** *Proc. R. Soc. Lond.*, 1989, vol. 236, 125-140 [0117]
- **ASKEW et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, vol. 111, 1082-1090 [0117]
- 20 • **ROBERTS R.W. ; SZOSTAK J.W.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94 (23), 12997-302 [0121]
- **COHEN B.A.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95 (24), 14272-7 [0122]
- 25 • **FIELDS ; SONG.** *Nature*, 1989, vol. 340, 245-6 [0122]
- **ANDERSON, B. ; J. DAHMEN ; F. TORBJÖRN ; H. LEFFLER ; G. MAGNUSON ; G. NOORI ; C. SVANBORG EDEN.** Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J. Exp. Med.*, 1983, vol. 158, 559-570 [0178]
- 30 • **ANDERSON, B. ; B. ERIKSSON ; E. FALSEN ; A. FOGH ; L. Å. HANSON ; O. NYLÉN ; H. PETERSON ; C. SVANBORG EDÉN.** Adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells in vitro: differences in adhesive capacity among strains isolated from subjects with otitis media, septicemia, or meningitis or from healthy carriers. *Infect. Immun.*, 1981, vol. 32, 311-317 [0178]
- 35 • **BERRY, A. M. ; J. C. PATON.** Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, 5255-5262 [0178]
- 40 • **BLACK, S. ; H. SHINEFIELD ; B. FIREMAN ; E. LEWIS ; P. RAY ; J. HANSEN ; L. ELVIN ; K. ENSOR ; J. HACKELL ; G. SIBER.** Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr. Infect Dis. J.*, 2000, vol. 19, 187-195 [0178]
- 45 • **BERRY, A. M. ; J. C. PATON ; J. S. BRILES, D. E. ; E. ADES ; J. C. PATON ; J. S. SAMPSON ; G. M. CARLONE ; R. C. HUEBNER ; A. VIROLAINEN ; E. SWIATLO ; S. K. HOLLINGSHEAD.** Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, 796-800 [0178]
- 50 • **SMITH et al.** Antibodies in Human Diagnosis and Therapy. Raven Press, 1977, 365-389 [0105]
- 55 • **MUNSON et al.** *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0110]
- **ROTIVINEN et al.** *Acta Pharmaceutica Fennica*, 1988, vol. 97, 159-166 [0117]
- **RIPKA.** *New Scientist*, 16 June 1988, 54-57 [0117]
- 60 • **MCKINALY ; ROSSMANN.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1989, vol. 29, 111-122 [0117]
- **PERRY ; DAVIES.** QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design. Alan R. Liss, Inc, 1989, 189-193 [0117]
- 65 • **LEWIS ; DEAN.** *Proc. R. Soc. Lond.*, 1989, vol. 236, 125-140 [0117]
- **ASKEW et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, vol. 111, 1082-1090 [0117]
- **ROBERTS R.W. ; SZOSTAK J.W.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94 (23), 12997-302 [0121]
- **COHEN B.A.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95 (24), 14272-7 [0122]
- **FIELDS ; SONG.** *Nature*, 1989, vol. 340, 245-6 [0122]
- **ANDERSON, B. ; J. DAHMEN ; F. TORBJÖRN ; H. LEFFLER ; G. MAGNUSON ; G. NOORI ; C. SVANBORG EDEN.** Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J. Exp. Med.*, 1983, vol. 158, 559-570 [0178]
- **ANDERSON, B. ; B. ERIKSSON ; E. FALSEN ; A. FOGH ; L. Å. HANSON ; O. NYLÉN ; H. PETERSON ; C. SVANBORG EDÉN.** Adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells in vitro: differences in adhesive capacity among strains isolated from subjects with otitis media, septicemia, or meningitis or from healthy carriers. *Infect. Immun.*, 1981, vol. 32, 311-317 [0178]
- **BERRY, A. M. ; J. C. PATON.** Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, 5255-5262 [0178]
- **BLACK, S. ; H. SHINEFIELD ; B. FIREMAN ; E. LEWIS ; P. RAY ; J. HANSEN ; L. ELVIN ; K. ENSOR ; J. HACKELL ; G. SIBER.** Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr. Infect Dis. J.*, 2000, vol. 19, 187-195 [0178]
- **BERRY, A. M. ; J. C. PATON ; J. S. BRILES, D. E. ; E. ADES ; J. C. PATON ; J. S. SAMPSON ; G. M. CARLONE ; R. C. HUEBNER ; A. VIROLAINEN ; E. SWIATLO ; S. K. HOLLINGSHEAD.** Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, 796-800 [0178]
- Preventing pneumococcal disease among infants and young children: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR*, 2000, vol. 49 (RR-09), 1-38 [0178]
- **COFFEY, T. J. ; M. C. ENRIGHT ; M. DANIELS ; J. K. MORONA ; R. MORONA ; W. HRYNIEWICZ ; J. C. PATON ; B. G. SPRATT.** Recombinatorial exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 1998, vol. 27, 73-83 [0178]
- **CUNDELL, D. R. ; J. N. WEISER ; J. SHEN ; A. YOUNG ; E. I. TUOMANEN.** Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1995, vol. 63, 757-761 [0178]
- **DAGAN, R. ; R. MELAMED ; M. MUALLEM ; L. PIGLANSKY ; D. GREENBERG ; O. ABRAMSON ; P. M. MENDELMAN ; N. BOHIDAR ; P. YAGUPSKY.** Reduction of nasopharyngeal carriage of pneumococci during the second year of life by a heptavalent conjugate pneumococcal vaccine. *J. Infect. Dis.*, 1996, vol. 174, 1271-1278 [0178]
- **DINTILHAC, A. ; G. ALLOING ; C. GRANADEL ; J-P, CLAVERY.** Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol. Microbiol.*, 1997, vol. 25, 727-739 [0178]
- **JOHNSON, S ; DYKES, J K ; JUE, D ; SAMPSON, JS ; CARLONE, GM ; ADES, EW.** Inhibition of pneumococcal carriage in mice by subcutaneous immunization with peptides from the common surface protein Pneumococcal Surface Adhesin A. *J. Infect. Dis.*, 2002, vol. 185, 489-96 [0178]
- **JOHNSTON, J. W. ; L. E. MYERS ; M. M. OCHS ; W. H. BENJAMIN, JR. ; D. E. BRILES ; S. K. HOLLINGSHEAD.** Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: surface accessibility and role in protection from superoxide. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, 5858-5867 [0178]
- **MORRISON, K. E. ; D. LAKE ; J. CROOK ; G. M. CARLONE ; E. ADES ; R. FACKLAM ; J. S. SAMPSON.** Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2000, vol. 38, 434-437 [0178]
- **OBARO, S. K. ; R. A. ADEGBOLA ; W. A. S. BANYA ; B. M. GREENWOOD.** Carriage of pneumococci after pneumococcal vaccination. *Lancet*, 1996, vol. 348, 271-272 [0178]
- **OGUNNIYI, A. D. ; R. L. FOLLAND ; D. E. BRILES ; S. K. HOLLINGSHEAD ; J. C. PATON.** Immunization of mice with combination of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 2000, vol. 68, 3028-3033 [0178]

- 5 • Natural history of experimental otitis media due to PspA, PsaA or CbpA deficient mutants, abstr. 038. **PELTON, S. I. M. ; FIGUEIRA, R. ALBUT ; J. REINO.** Program and Abstracts of the Second International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases 2000. SmithKline Beecham Pharmaceuticals, 2000 [0178]
- 10 • **RAPOLA, S. ; V. JANTTI ; R. HAIKALA ; R. SYRJANEN ; G. M. CARLONE ; J. S. SAMPSON ; D. E. BRILES ; J. C. PATON ; A. K. TAKALA ; T. M. KILPI.** Natural development of antibodies to pneumococcal surface protein A, pneumococcal surface adhesin A, and pneumolysin in relation to pneumococcal carriage and acute otitis media. *J. Infect. Dis.*, 2000, vol. 182, 1146-1152 [0178]
- 15 • **ROMERO-STEINER, S ; PILISHVILI, T ; SAMPSON J ; JOHNSON S ; STINSON, A ; CARLONE, G ; ADES E.** Inhibition of Pneumococcal Adherence to Human Nasopharyngeal Epithelial Cells by Anti-Psa Antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunology*, 2001, vol. 10, 246-251 [0178]
- 20 • **SAMPSON, J. S. ; S. P. O'CONNOR ; A. R. STINSON ; J. A. THARPE ; H. RUSSELL.** Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus* sp. adhesins. *Infect. Immun.*, 1994, vol. 62, 319-324 [0178]
- 25 • **SEO, J-Y. ; S. Y. SEONG ; B-Y. AHN ; I. C. KWON ; H. CHUNG ; S. Y. JEONG.** Cross-protective immunity of mice induced by oral immunization with pneumococcal surface adhesin A encapsulated in microspheres. *Infect. Immun.*, 2002, vol. 70, 1143-1149 [0178]
- 30 • **SRIVASTAVA, N. ; J.L. ZEILER ; S.L. SMITHSON et al.** Selection of an immunogenic and protective epitope of the PsaA protein of *Streptococcus pneumoniae* using phage display library. *Hybridoma*, 2000, vol. 19, 23-31 [0178]
- **THARPE, J. A. ; H. RUSSELL ; M. LEINONEN ; B.D. PLIKAYTIS ; R. F. BREIMAN ; G. M. CARLONE ; E. W. ADES ; J. S. SAMPSON.** Comparison of a pneumococcal common protein (PsaA) antibody ELISA and a PsaA immune complex ELISA for detection of pneumococcal serum antibody. *Pathobiology*, 1998, vol. 66, 77-83 [0178]
- **WEISER, J. N. ; E. I. TUOMANEN ; D. R. CUNDELL ; P.K. SREENIVASAN ; R. AUSTRIAN ; H. R. MASURE.** The effect of colony opacity variation on pneumococcal colonization and adhesion. *J. Cell. Biochem.*, 1994, vol. 18A, 55 [0178]
- **WEISER, J. N. ; Z. MARKIEWICZ ; E. I. TUOMANEN ; J. H. WANI.** Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 1996, vol. 64, 2240-2245 [0178]