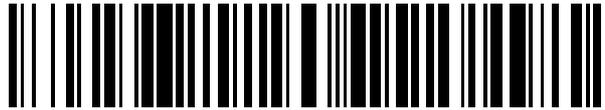


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 620**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/02** (2006.01)  
**A61K 39/085** (2006.01)  
**A61K 39/09** (2006.01)  
**A61K 39/38** (2006.01)  
**A61K 39/385** (2006.01)  
**C07K 1/00** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**C12N 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2003 E 03768757 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 1558280**

54 Título: **Composiciones y métodos destinados a tratar o prevenir la infección neumocócica**

30 Prioridad:

**07.11.2002 US 424497 P**

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

**28.03.2014**

73 Titular/es:

**SYNERGY AMERICA, INC. (100.0%)  
9700 GREAT SENECA HIGHWAY, SUITE 185  
ROCKVILLE, MD 20850-3308, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, MICHAEL C.;  
CHIOU, CHUANG-JIUN;  
LI, ZHONGMING y  
CHEN, DONG-SHENG**

74 Agente/Representante:

**MORGADES MANONELLES, Juan Antonio**

**ES 2 451 620 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

Composiciones y métodos destinados a tratar o prevenir la infección neumocócica

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a polipéptidos, conjugados neumocócicos de polisacáridos y polipéptidos, vectores de expresión que codifican polipéptidos neumocócicos, métodos para provocar una respuesta inmunitaria antineumocócica, y métodos de tratamiento y prevención de la infección neumocócica.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) es una causa común de neumonía bacteriana, meningitis, otitis media y bacteriemia en niños, ancianos, y personas con inmunodeficiencia. El *S. pneumoniae* se puede subdividir en aproximadamente 90 serotipos, basándose en el polisacárido capsular del organismo. Sin embargo, la enfermedad está provocada generalmente por aproximadamente 30 tipos de cepas de *S. pneumoniae*. La Organización Mundial de la Salud estima que se produce un millón de muertes de niños a causa a la meningitis y la septicemia neumocócicas cada año, produciéndose el 98% de dichas muertes en países en vías de desarrollo. La aparición de cepas neumocócicas con resistencia a los antibióticos pone de manifiesto la necesidad del tratamiento y la prevención de la infección neumocócica mediante otros métodos además de los antibióticos. El documento EP 687 688 describe anticuerpos monoclonales específicos para la neumolisina que podría utilizarse en el diagnóstico, la profilaxis y la citólisis.

15

20

## SUMARIO DE LA INVENCION

25

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición que contiene un polipéptido conjugado con un polisacárido capsular de *S. pneumoniae*, en la que el polipéptido contiene un fragmento de por lo menos 400 aminoácidos contiguos de una proteína neumolisina de *S. pneumoniae*, careciendo el polipéptido de la secuencia de aminoácidos KVEND (SEC ID N.º: 22) (por ejemplo, en la región carboxiterminal), careciendo el polipéptido de actividad hemolítica, y en la que la composición provoca una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular) contra el *S. pneumoniae* cuando se administra a un mamífero. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria preventiva y/o terapéutica.

30

35

El polipéptido consiste en los aminoácidos 1 a 464 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 465 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 469 de la SEC ID N.º: 1 o los aminoácidos 1 a 470 de la SEC ID N.º: 1.

El polipéptido puede carecer opcionalmente la secuencia de aminoácidos EDKVEND (SEC ID N.º: 23).

40

En algunas formas de realización, el polisacárido capsular se selecciona de entre el grupo que comprende los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. En un ejemplo, el polisacárido capsular es del serotipo 14. En un ejemplo, el polisacárido capsular es del serotipo 18C. La composición puede contener opcionalmente una pluralidad de polisacáridos capsulares distintos seleccionados de entre el grupo que consiste en los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.

45

La respuesta inmunitaria provocada por la composición se puede dirigir contra un polisacárido capsular de *S. pneumoniae*, contra una proteína neumolisina de *S. pneumoniae*, o contra un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* y una proteína neumolisina de *S. pneumoniae*.

50

Se describe asimismo un vector de expresión de mamífero que contiene un promotor unido de un modo funcional a una secuencia de nucleótidos que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene un fragmento de por lo menos 400 aminoácidos contiguos de una proteína neumolisina de *S. pneumoniae*, careciendo el polipéptido de la secuencia de aminoácidos KVEND (SEC ID N.º: 22) (por ejemplo, en la región carboxiterminal), careciendo el polipéptido de actividad hemolítica, y en el que el polipéptido provoca una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular) contra el *S. pneumoniae* cuando se administra el vector de expresión a un mamífero. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria preventiva y/o terapéutica.

55

60

La proteína neumolisina de *S. pneumoniae* puede presentar la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 1. En algunas formas de realización, el polipéptido codificado contiene los aminoácidos 1 a 460 de la SEC ID N.º: 1. En otras formas de realización, el polipéptido codificado contiene los aminoácidos 1 a 464 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 465 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 469 de la SEC ID N.º: 1 o los aminoácidos 1 a 470 de la SEC ID N.º: 1.

65

El polipéptido codificado puede carecer opcionalmente de la secuencia de aminoácidos EDKVEND (SEC ID N.º: 23) o de la secuencia de aminoácidos YPQVEDKVEND (SEC ID N.º: 24).

En algunas formas de realización, el polipéptido codificado consiste en los aminoácidos 1 a 460 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 464 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 465 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 466 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 469 de la SEC ID N.º: 1 o los aminoácidos 1 a 470 de la SEC ID N.º: 1.

5 La respuesta inmunitaria provocada por el polipéptido codificado se puede dirigir contra una proteína neumolisina de *S. pneumoniae*.

10 Se describe asimismo un vector de expresión de mamífero que contiene un promotor unido de un modo funcional a una secuencia de nucleótidos que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de autolisina de *S. pneumoniae*, en el que el polipéptido provoca una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular) contra el *S. pneumoniae* cuando se administra el vector de expresión a un mamífero. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria preventiva y/o terapéutica.

15 En algunas formas de realización, el polipéptido codificado contiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 14. En otras formas de realización, el polipéptido codificado consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 14.

20 Se describe además un vector de expresión de mamífero que contiene un promotor unido de un modo funcional a una secuencia de nucleótidos que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la proteína A de superficie neumocócica de *S. pneumoniae*, en el que el polipéptido provoca una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular) contra el *S. pneumoniae* cuando se administra el vector de expresión a un mamífero. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria preventiva y/o terapéutica.

25 En algunas formas de realización, el polipéptido codificado contiene la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 18. En algunas formas de realización, el polipéptido codificado consiste en la secuencia de aminoácidos SEC ID N.º: 18.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de una composición tal como se ha definido anteriormente para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero administrando a un mamífero una cantidad de una composición descrita en la presente memoria que es efectiva para provocar una respuesta inmunitaria contra *S. pneumoniae* en el mamífero. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria preventiva y/o terapéutica.

35 En algunas formas de realización, la respuesta inmunitaria es una reacción cruzada contra por lo menos un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* que difiere del serotipo del polisacárido capsular (por ejemplo, los serotipos 7, 6B, 18C o 23F) presente en la composición. En algunas formas de realización, la respuesta inmunitaria es una reacción cruzada contra por lo menos un elemento del género *Streptococcus* que no es *Streptococcus pneumoniae*.

40 Se describe asimismo la provocación de una respuesta inmunitaria en un mamífero administrando a un mamífero una cierta cantidad de un vector de expresión descrito en la presente memoria (por ejemplo, un vector de expresión de la neumolisina, la seudoneumolisina, la autolisina o la proteína A de la superficie neumocócica) que es efectiva para provocar una respuesta inmunitaria contra *S. pneumoniae* en el mamífero. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria preventiva y/o terapéutica. En algunas formas de realización, la respuesta inmunitaria es una reacción cruzada contra por lo menos un elemento del género *Streptococcus* que no es *Streptococcus pneumoniae*.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de un vector de expresión de mamífero que contiene un promotor unido de un modo funcional a una secuencia de nucleótidos que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* o un fragmento antigénico del mismo, y la administración al mamífero del polipéptido de neumolisina purificado de *S. pneumoniae* o fragmento antigénico del mismo, para la preparación de medicamentos destinados a la administración combinada para provocar una respuesta inmunitaria contra la neumolisina de *S. pneumoniae* en el mamífero.

50 En algunas formas de realización, se administra al mamífero por lo menos dos, tres o más dosis separadas del vector de expresión. Las dosis pueden separarse opcionalmente por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días.

55 En algunas formas de realización, la administración del polipéptido de neumolisina o fragmento antigénico del mismo de *S. pneumoniae* se realiza por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días tras la administración del vector de expresión.

60 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición que contiene un polipéptido conjugado con un polisacárido bacteriano que no procede de *S. pneumoniae*, en la que el polipéptido contiene un fragmento de por lo menos 400 aminoácidos contiguos de una proteína neumolisina de *S. pneumoniae*, careciendo el polipéptido de la secuencia de aminoácidos KVEND (SEC ID N.º: 22), careciendo el polipéptido de actividad hemolítica, y en la que la composición provoca una respuesta inmunitaria contra la bacteria que no es *S. pneumoniae* cuando se administra a un mamífero. El polipéptido consiste en los aminoácidos 1 a 464 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 465 de la SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 469 de la SEC ID N.º: 1 o los aminoácidos 1 a 470 de la SEC ID N.º: 1.

1. En algunos ejemplos, la bacteria que no es *Streptococcus pneumoniae* se selecciona de entre el grupo que consiste el neumococo, *Haemophilus influenzae* del tipo B, los grupos meningocócicos A, B o C, y el estreptococo del grupo B del tipo Ia, Ib, II, III, V o VIII. Dicha composición se puede utilizar para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero administrando a un mamífero una cantidad de una composición efectiva para provocar una respuesta inmunitaria contra la bacteria que no es *S. pneumoniae* en el mamífero.

Se describe asimismo un anticuerpo purificado que se une (por ejemplo, se une selectivamente) a una composición o polipéptido descrito en la presente memoria. Por ejemplo, un anticuerpo se puede unir específicamente a una composición que contiene un polipéptido conjugado con un polisacárido capsular de *S. pneumoniae*, en la que el polipéptido contiene un fragmento de por lo menos 400 aminoácidos contiguos de una proteína neumolisina de *S. pneumoniae*, careciendo el polipéptido de la secuencia de aminoácidos KVEND (SEC ID N.º: 22) (por ejemplo, en la región carboxiterminal), careciendo el polipéptido de actividad hemolítica, y en la que la composición provoca una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria humoral y/o una respuesta inmunitaria celular) contra el *S. pneumoniae* cuando se administra a un mamífero. Dicho anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o policlonal. Se pueden preparar estirpes celulares tales como hibridomas de tal modo que secreten un anticuerpo descrito en la presente memoria. El anticuerpo se puede utilizar para tratar o prevenir una infección por *Streptococcus pneumoniae* en un mamífero administrando al mamífero una cantidad terapéuticamente o preventivamente efectiva del anticuerpo purificado.

Una ventaja de la invención es que, en algunas formas de realización, un conjugado de polipéptido y polisacárido de un primer serotipo de *S. pneumoniae* puede proporcionar inesperadamente una protección cruzada contra la infección provocada por un segundo serotipo de *S. pneumoniae*. Dicha protección cruzada puede aumentar la efectividad de un conjugado determinado al tratar o prevenir una infección por más de un serotipo *S. pneumoniae*. Por consiguiente, se puede proporcionar protección contra una pluralidad de serotipos de *S. pneumoniae* sin administrar necesariamente conjugados para cada serotipo específico.

Otra ventaja de la presente invención es que los polipéptidos de seudoneumolisina carecen de actividad hemolítica. Por consiguiente, dichos conjugados de seudoneumolisina y vectores de expresión presentan una toxicidad reducida o carecen de la misma en comparación con composiciones que contienen neumolisina natural que presenta actividad hemolítica o un toxoide antineumolisina que presenta actividad hemolítica parcial.

Otra ventaja de la presente invención es que, en algunas formas de realización, los vectores de expresión que codifican formas truncadas de neumolisina, a diferencia de los ácidos nucleicos que codifican mutaciones puntuales de la neumolisina, es poco probable que se inviertan y codifiquen una proteína tóxica que presente actividad hemolítica. Debido a que las formas truncadas de neumolisina carecen de una región de la neumolisina que contribuya a la actividad hemolítica, cualquier mutación en la secuencia de nucleótidos del vector de expresión debe ser incapaz de regenerar la actividad tóxica.

Excepto si se indica lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto ordinario en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o ensayos de la presente invención se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, a continuación se describirán los métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto en la terminología, prevalecerá la presente memoria descriptiva. Además, los materiales y métodos descritos se proporcionan únicamente a título ilustrativo y no se pretende que sean limitativos.

Otras características y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antineumolisina obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14.

La figura 2 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antipolisacárido obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14.

La figura 3 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antineumolisina obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 18C.

La figura 4 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antipolisacárido obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 18C.

La figura 5 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antineumolisina obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 19F.

La figura 6 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antipolisacárido obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 19F.

La figura 7 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antineumolisina obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 23F.

La figura 8 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antipolisacárido obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 23F.

La figura 9 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antineumolisina obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 4.

5 La figura 10 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antipolisacárido obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 4.

La figura 11 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antineumolisina obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 6B.

10 La figura 12 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antipolisacárido obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 6B.

La figura 13 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antineumolisina obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 9V.

La figura 14 es un gráfico que representa la producción de un anticuerpo IgG antipolisacárido obtenido en ratones tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 9V.

15 La figura 15 es un gráfico que representa la respuesta de los anticuerpos al polisacárido del serotipo 14 de *S. pneumoniae* tras una tercera inyección con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14 de *S. pneumoniae*.

La figura 16 es un gráfico que representa la respuesta de los anticuerpos en conejos contra la neumolisina utilizando una estrategia de sensibilización de recuerdo para la vacuna de ADN de seudoneumolisina.

20 La figura 17 es un gráfico que representa una respuesta de los anticuerpos tras la inyección con una vacuna de ADN de un vector de expresión que codifica la proteína A de superficie neumocócica.

La figura 18 es un gráfico que representa una respuesta de los anticuerpos tras la inyección con una vacuna de ADN de un vector de expresión que codifica la autolisina.

25 La figura 19 es un gráfico que representa la eliminación de bacterias en ratones expuestos al serotipo 14 de *S. pneumoniae* tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del tipo 14.

La figura 20 es un gráfico que representa la eliminación de bacterias en ratones expuestos al serotipo 7 de *S. pneumoniae* tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del tipo 14.

30 La figura 21 es un gráfico que representa la eliminación de bacterias en ratones expuestos al serotipo 6B de *S. pneumoniae* tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14.

La figura 22 es un gráfico que representa la eliminación de bacterias en ratones expuestos al serotipo 18C de *S. pneumoniae* tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14.

La figura 23 es un gráfico que representa la eliminación de bacterias 1 hora después de la exposición al serotipo 23F de *S. pneumoniae* tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14.

35 La figura 24 es un gráfico que representa la eliminación de bacterias 3 horas después de la exposición al serotipo 23F de *S. pneumoniae* tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14.

La figura 25 es un gráfico que representa la eliminación de bacterias 5 horas después de la exposición al serotipo 23F de *S. pneumoniae* tras la inmunización con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 La presente invención proporciona composiciones y métodos destinados a tratar o prevenir la infección neumocócica. Cuando se administran a un mamífero los polipéptidos, los conjugados de polipéptido y polisacárido, y los vectores de expresión descritos en la presente memoria, provocan una respuesta inmunitaria antineumocócica en el mamífero. Dichas composiciones se pueden usar preventivamente para vacunar a un paciente y/o terapéuticamente para provocar una respuesta inmunitaria terapéutica en un paciente infectado.

## CONJUGADOS DE POLISACÁRIDO Y PROTEÍNA

50 Puede conjugarse un polipéptido con un polisacárido capsular de *S. pneumoniae* mediante métodos covalentes o no covalentes. En general, el componente polipeptídico del conjugado contiene una parte de una proteína neumolisina de *S. pneumoniae* o un proteína neumolisina mutada de *S. pneumoniae*; carece de la secuencia de aminoácidos KVEND (SEC ID N.º: 22); y carece de actividad hemolítica. El conjugado de polisacárido y polipéptido provoca una respuesta inmunitaria contra *S. pneumoniae* cuando se administra a un mamífero. La respuesta inmunitaria se puede dirigir contra el polipéptido, el polisacárido o la combinación del polipéptido y el polisacárido.

55 El componente polipéptido del conjugado se puede preparar utilizando tecnología de ADN recombinante, purificada a partir de fuentes naturales o sintetizado químicamente. En general, el componente polipeptídico difiere en la secuencia de aminoácidos de una proteína neumolisina natural de *S. pneumoniae*. La secuencia del polipéptido neumolisina del tipo 19A de *S. pneumoniae* se representa en la SEC ID N.º: 1 (véase el ejemplo 1). Los ejemplos de componentes polipeptídicos de un conjugado comprenden, pero sin limitarse a los mismos, los aminoácidos 1 a 460, 1 a 461, 1 a 462, 1 a 463, 1 a 464, 1 a 465, 1 a 466, 1 a 469 y 1 a 470 de la SEC ID N.º: 1.

65 Los ácidos nucleicos que codifican las formas truncadas y/o mutadas de una proteína neumolisina de *S. pneumoniae* se pueden preparar, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas se pueden elegir por presentar codones, que son preferidos o no preferidos, para un sistema de expresión particular. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser uno en el que por lo

menos un codón, preferentemente por lo menos el 10% o el 20% de los codones se han alterado de tal modo que la secuencia está optimizada para la expresión en *E. coli*, levaduras, seres humanos, insectos o células CHO.

Los ácidos nucleicos que codifican formas truncadas y/o mutadas de una proteína neumolisina de *S. pneumoniae* se pueden fusionar con secuencias de nucleótidos que codifican (1) otras proteínas neumocócicas, tales como la autolisina, la proteína A de superficie, la neuraminidasa, el lisado de hialuronato, la colina de unión con la proteína A, o (2) proteínas no neumocócicas de organismos tales como *Haemophilus influenzae* de tipo b, el meningococo de los grupos A, B, o C, o los estreptococos del grupo B. Los ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas fusionadas se expresan en los sistemas de expresión.

Las formas truncadas de neumolisina pueden ser portadoras útiles de polisacáridos, ya que los anfitriones pueden carecer de anticuerpos preexistentes para dicho polipéptido portador. La neumolisina es un factor de virulencia en las infecciones neumocócicas y se produce poca variación antigénica de la neumolisina entre los neumococos con distintos subtipos.

El conjugado de polisacárido y proteína, cuando se administra a un mamífero tal como un ser humano, provoca una respuesta inmunitaria que supera en magnitud, tipo y/o duración la respuesta inmunitaria provocada mediante la administración a un mamífero de únicamente el componente polisacárido. Por consiguiente, el componente polipeptídico debe presentar una longitud suficiente para provocar dicha respuesta inmunitaria mejorada. En el caso de fragmentos de una proteína neumolisina natural de *S. pneumoniae*, los fragmentos deben presentar una longitud de por lo menos 8, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 425, 450, 460, 465, 466, 467 o más aminoácidos. En el caso de los polipéptidos, que varían en la secuencia de una proteína neumolisina natural de *S. pneumoniae*, el polipéptido puede ser por lo menos aproximadamente el 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o más idéntica a una proteína neumolisina natural de *S. pneumoniae*, por ejemplo, la SEC ID N<sup>o</sup>: 1.

El componente polipeptídico carece preferentemente de la actividad hemolítica presente en una proteína neumolisina natural de *S. pneumoniae*. Generalmente, el componente polipeptídico presenta menos del 30%, 20%, 10%, 5%, 1% o menos de actividad hemolítica que una proteína neumolisina natural de *S. pneumoniae*. La actividad hemolítica se puede determinar tal como se detalla en el ejemplo 3. En general, la actividad hemolítica de un polipéptido se puede determinar incubando el polipéptido con eritrocitos, por ejemplo, eritrocitos de oveja, y midiendo la hemólisis provocada por el polipéptido (véase, por ejemplo, Owen *et al.* (1994) *FEMS Microbiology Letters* 121:217-222 para un ejemplo de descripción de un ensayo hemolítico).

El componente polisacárido del conjugado puede ser cualquier polisacárido capsular de *S. pneumoniae*, comprendiendo pero sin limitarse a los mismos, cualquiera de los subtipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 19A, 20, 22F, 23A, 23F, 24F, 27, 33F o 34. En algunas formas de realización, el polisacárido capsular se selecciona de entre los subtipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F o 23F. En algunas formas de realización, el polisacárido es del serotipo 14. En otras formas de realización, el polisacárido es del serotipo 18C. Se pueden conjugar uno o más polisacáridos capsulares distintos con un solo polipéptido o una pluralidad de polipéptidos. Por ejemplo, un conjugado polivalente puede comprender por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 polisacáridos capsulares distintos. Los polisacáridos se pueden conjugar con polipéptidos, por ejemplo, mediante un enlace monomérico (únicamente un extremo del polisacárido se une al polipéptido), una unión en bucle (un solo polipéptido se une a los polisacáridos en bucle) o reticulado (una pluralidad de polisacáridos unidos a una pluralidad de polipéptidos).

Los métodos de purificación de polipéptidos, por ejemplo, los polipéptidos de pseudoneumolisina descritos en los ejemplos, y la conjugación de los polisacáridos con los polipéptidos se describen en el ejemplo 4. Los detalles adicionales correspondientes a los procesos de purificación y conjugación de polipéptidos o polisacáridos se describen en, por ejemplo, las patentes US n.º 4.242.501; 4.686.102; 5.623.057; y 5.565.204.

Los conjugados o polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden administrar a un mamífero para provocar una respuesta inmunitaria (una respuesta inmunitaria preventiva y/o terapéutica) contra el *S. pneumoniae* en el mamífero. Se puede administrar una composición farmacéutica que contenga un conjugado o polipéptido en un vehículo, una disolución amortiguadora o un conservante farmacéuticamente aceptable que sea apto para una vacuna comprendiendo, pero sin limitarse a los mismos, una disolución salina isotónica u otros líquidos inyectables. Pueden estar asimismo presentes los aditivos habituales en las vacunas, por ejemplo, estabilizantes tales como la lactosa o el sorbitol, y aditivos destinados a mejorar la respuesta inmunógena tales como el fosfato, el hidróxido o el sulfato de aluminio y la lecitina. La vacuna producida se puede utilizar asimismo como componente de vacunas polivalentes que provoquen una respuesta inmunitaria contra una pluralidad de agentes infecciosos.

Las composiciones se pueden administrar de cualquier modo conocida en la técnica, por ejemplo, por vía oral, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal, intradérmica, intraperitoneal, intranasal, intrapulmonar, intraocular, intravaginal, intrarrectal o subcutánea. Se pueden introducir en el tracto gastrointestinal o en las vías respiratorias, por ejemplo, mediante la inhalación de una disolución o polvo que contenga los conjugados. En algunas formas de realización, las composiciones se pueden administrar a través de un parche cutáneo.

Se administra una composición farmacéutica (por ejemplo, una vacuna) en una cantidad suficiente para provocar la producción de anticuerpos como parte de una respuesta inmunógena. La dosificación para un paciente determinado depende de muchos factores, entre ellos el tamaño del paciente, el estado general de salud, el sexo, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular a administrar, el tiempo y la vía de administración, y los otros fármacos que se administran simultáneamente. La determinación de la dosis óptima forma parte de las capacidades ordinarias de un farmacólogo.

Se puede analizar la capacidad de una composición para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero hospedador utilizando métodos para la medición de las respuestas inmunitarias que resultan muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede demostrar la generación de linfocitos T citotóxicos en una prueba de liberación de <sup>51</sup>Cr estándar, determinando la expresión o la secreción intracelular de citocinas, o utilizando tetrámeros del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Se pueden utilizar pruebas estándar, tales como la prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) o el ensayo de puntos por inmunoabsorción unida a enzimas (ELISPOT) para determinar los perfiles de las citocinas que se pueden atribuir a la activación de los linfocitos T. Se puede determinar la proliferación de los linfocitos T utilizando pruebas tales como la captación de la <sup>3</sup>H-timidina y otros ensayos conocidos en la técnica. Se pueden determinar las respuestas de los linfocitos B utilizando ensayos reconocidos en la técnica tales como la prueba ELISA. Se pueden utilizar asimismo otras metodologías para analizar los efectos de los conjugados sobre las lesiones relacionadas con patógenos o en otros niveles de patógenos en general (por ejemplo, la eliminación de neumococos en ratones estimulados tratados con el conjugado).

La composición descrita en la presente memoria se puede utilizar en la realización de un medicamento destinado a la prevención o el tratamiento de una infección con *S. pneumoniae* o trastornos relacionados con dicha infección.

## ANTICUERPOS

Los anticuerpos dirigidos contra un polisacárido, la neumolisina o una combinación de los mismos se pueden utilizar en una aplicación preventiva o terapéutica para proporcionar inmunidad de un primer paciente a un segundo paciente (por ejemplo, para aumentar la respuesta inmunitaria del segundo paciente contra *S. pneumoniae* o para proporcionar una respuesta si el segundo paciente es un paciente inmunodeficiente). Los anticuerpos dirigidos contra un polisacárido, la neumolisina o una combinación de los mismos se pueden generar en un hospedador inmunocompetente (por ejemplo, administrando al hospedador inmunocompetente un conjugado descrito en la presente memoria), cosecharse a partir del hospedador y transfundirse a un receptor que necesita el tratamiento o la profilaxis, proporcionando de este modo resistencia al destinatario no únicamente contra la toxina neumolisina, sino asimismo contra el *S. pneumoniae* y cualquier otra bacteria posible que se una a los anticuerpos producidos por el conjugado (por ejemplo, el componente polisacárido del conjugado).

Se pueden formular los anticuerpos provocados por una composición descrita en la presente memoria como una composición farmacéutica y utilizarse para proporcionar una respuesta inmunitaria preventiva o terapéutica a un paciente. En la presente memoria se describen los componentes y métodos adecuados de administración para las composiciones farmacéuticas. Para provocar inmunidad pasiva, la composición farmacéutica puede comprender anticuerpos policlonales o anticuerpos monoclonales o derivados de fragmentos de los mismos. La composición farmacéutica contiene una cantidad preventiva o terapéuticamente efectiva de un anticuerpo, fragmento o derivado, según determinan las técnicas clínicas estándar.

## ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN POLIPÉPTIDOS NEUMOCÓCICOS

Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido neumocócico o un fragmento o variante de polipéptido neumocócico se pueden administrar a un mamífero (por ejemplo, un ser humano) para generar una respuesta inmunitaria preventiva y/o terapéutica en el mamífero. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria humoral y/o celular antineumocócica.

Los polipéptidos que se pueden codificar mediante los constructos de ácidos nucleicos comprenden los componentes polipeptídicos de los conjugados descritos en la presente memoria, los polipéptidos de pseudoneumolisina descritos en los ejemplos, así como la autolisina y la proteína A de superficie neumocócica, y fragmentos y variantes de los mismos. Además, un ácido nucleico puede codificar una combinación de dos o más de dichos polipéptidos, fragmentos, o variantes.

Los constructos de expresión de los ácidos nucleicos se pueden preparar utilizando métodos estándar de ADN recombinante. Se pueden incorporar elementos reguladores a un constructo para facilitar la expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Dichos elementos comprenden secuencias destinadas a potenciar la expresión en las células humanas o de otros mamíferos, por ejemplo, promotores, secuencias de estabilización de ARN 5' y/o 3' de la secuencia codificante, intrones (que se pueden disponer en cualquier ubicación dentro o adyacente a la secuencia codificada), y sitios de adición de una cola poli(A), así como un origen de replicación y uno o más genes que codifiquen marcadores seleccionables que permitan que se repliquen y seleccionen constructos en hospedadores procariontes y/o eucariotes. Un promotor de la polimerasa T7 u otro tipo de promotor (por ejemplo, un

promotor específico de un tejido o un promotor específico de una célula tal como un promotor específico del músculo) se encuentra opcionalmente presente en el extremo 5' de la secuencia codificante, y una secuencia que codifica un FLAG u otro determinante mAb se encuentra presente opcionalmente en el extremo 3' de la secuencia codificante. El constructo puede comprender asimismo otras señales de transcripción y traducción, tales como una secuencia Kozak.

El constructo puede comprender además una secuencia que codifique una señal de acceso que dirige el polipéptido codificado a un compartimento intracelular pretendido, enlazándose la señal de acceso al polipéptido. Las señales de acceso pueden dirigir el polipéptido codificado al retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi, el núcleo, un lisosoma, un compartimento de carga de péptidos de clase II o un endosoma, comprenden péptidos señal, péptidos de retención del RE y péptidos de acceso a lisosomas.

Los ácidos nucleicos se pueden utilizar en cualquier vector que permita la expresión en las células de un mamífero. El vector puede ser, por ejemplo, un vector no vírico tal como un plásmido o un vector bacteriano, un vector vírico de integración o un vector vírico que no sea de integración. Un ejemplo de un vector apto es la familia de vectores de expresión de pcDNA de mamífero (Invitrogen), que permiten la clonación directa y rápida de los productos de la PCR.

Se pueden utilizar diversos sistemas de administración para administrar los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos en las células apropiadas. Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos se pueden administrar en un portador farmacéuticamente aceptable, tal como una disolución salina, o en forma de suspensiones coloidales o de polvos, con o sin diluyentes. Los ácidos nucleicos pueden estar "desnudos" o unidos a vehículos de administración y administrarse utilizando sistemas de administración conocidos en la técnica, tales como lípidos, liposomas, microesferas, micropartículas o microcápsulas, partículas de oro, ISCOM, nanopartículas, polímeros, agentes de condensación, polisacáridos, poliaminoácidos, dendrímeros, saponinas, QS21, materiales que mejoran la adsorción, aditivos o ácidos grasos. Los ácidos nucleicos se pueden administrar asimismo a una célula, por ejemplo, una célula de músculo esquelético, ya sea *in vitro* o *in vivo*, utilizando electroporación.

Los ácidos nucleicos se pueden administrar utilizando métodos estándar, por ejemplo, los descritos en Donnelly *et al.*, *J. Immunol. Methods* 176:145, 1994, y en Vitiello *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95:341, 1995, y se pueden administrar a los pacientes de cualquier modo conocido en la técnica, por ejemplo, por vía oral, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal, intradérmica, intraperitoneal, intranasal, intrapulmonar, intraocular, intravaginal, intrarrectal o subcutánea. Se pueden introducir en el tracto gastrointestinal o en las vías respiratorias, por ejemplo, mediante la inhalación de una disolución o polvo que contenga los ácidos nucleicos. La administración puede ser local o sistémica.

Se espera administrar a un paciente una dosis aproximadamente de 100 a 2000 µg de ácido nucleico. Cuando el paciente es un ser humano adulto, las pautas de vacunación pueden comprender, por ejemplo, la administración intramuscular, intradérmica, por inhalación o subcutánea de 10 a 1000 µg de un ADN de plásmido cuando se administra en una micropartícula, o aproximadamente de 10 a 2500 µg, por ejemplo, de 100 a 2000 o de 500 a 1000 µg, del plásmido de ADN desnudo administrado por vía intramuscular o intradérmica, repitiéndose de 3 a 6 veces. Tal como se conoce bien en la técnica médica, la dosificación para un paciente determinado depende de muchos factores, entre ellos el tamaño del paciente, el estado general de salud, el sexo, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular a administrar, el tiempo y la vía de administración, y los otros fármacos que se administran simultáneamente. La determinación de la dosis óptima forma parte de las capacidades ordinarias de un farmacólogo.

Se pueden utilizar asimismo otros métodos de administración estándar, por ejemplo, la transferencia biolística o el tratamiento *ex vivo*. En el tratamiento *ex vivo*, las células que presentan antígenos (APC) tales como células dendríticas, células mononucleares de sangre de la circulación general o células de médula ósea se pueden obtener a partir de un paciente o un donante apto y activarse *ex vivo* con el ácido nucleico y, a continuación, implantarse o volver a administrar por venoclisis al paciente.

Los ácidos nucleicos se pueden administrar solos o junto con otros tratamientos conocidos en la técnica, por ejemplo, antibióticos. Además, los ácidos nucleicos se pueden administrar junto con otros tratamientos destinados a mejorar la respuesta inmunitaria, por ejemplo, mediante la administración junto con aditivos, citocinas (o ácidos nucleicos que codifican citocinas), u oligonucleótidos CpG, tal como se conoce bien en la técnica.

Se puede analizar la capacidad de un ácido nucleico para provocar una respuesta inmunitaria en un mamífero hospedador utilizando métodos para la medición de las respuestas inmunitarias que resultan muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede demostrar la generación de linfocitos T citotóxicos en una prueba de liberación de <sup>51</sup>Cr estándar, determinando la expresión o la secreción intracelular de citocinas, o utilizando tetrámeros del (MHC). Se pueden utilizar pruebas estándar, tales como la prueba ELISA o la ELISPOT para determinar los perfiles de las citocinas que se pueden atribuir a la activación de los linfocitos T. Se puede determinar la proliferación de los linfocitos T utilizando pruebas tales como la captación de la <sup>3</sup>H-timidina y otros ensayos conocidos en la técnica. Se pueden determinar las respuestas de los linfocitos B utilizando ensayos reconocidos en la técnica tales como la

prueba ELISA. Se pueden utilizar asimismo otras metodologías para analizar los efectos de los ácidos nucleicos sobre las lesiones relacionadas con patógenos o en otros niveles de patógenos en general (por ejemplo, la eliminación de neumococos en ratones estimulados tratados con el conjugado).

5 Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria se pueden utilizar en la realización de un medicamento destinado a la prevención o el tratamiento de una infección con *S. pneumoniae* o trastornos relacionados con dicha infección.

10 La presente invención se continuará describiendo en los ejemplos siguientes, que no limitan el alcance de la presente invención descrita en las reivindicaciones.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: construcción de vectores de expresión de laseudoneumolisina

15 Los vectores destinados a expresar formas truncadas de un polipéptido de neumolisina se describen en los ejemplos 1A a 1E. Los polipéptidos truncados codificados, denominados polipéptidos de "seudoneumolisina", se pueden utilizar para la conjugación con polisacáridos neumocócicos en la preparación de vacunas conjugadas. Además, se puede administrar a un paciente un ácido nucleico que codifique un polipéptido de seudoneumolisina para generar una respuesta inmunitaria contra el polipéptido codificado.

20 Se realizó la PCR utilizando ADN cromosómico de tipo 19A de *S. pneumoniae* como plantilla para amplificar distintos fragmentos del gen de la neumolisina. El cebador homosentido utilizado en la reacción de la PCR se hibridó con la secuencia codificante del gen de la neumolisina justo en dirección 5' del codón de iniciación de la traducción y comprendía un sitio de una enzima de restricción específica. El cebador homosentido, indicado como LYSN-1 (5'-GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 2), es complementario a los nucleótidos 1 a 24 del extremo 5' del gen de la neumolisina. El cebador antisentido, indicado como LYSN-3 (5'-CAGTGGATCCTTACTAGTCATTTTCTACCTTATC-3'; SEC ID N.º: 3), es complementario a los nucleótidos 1396 a 1413 de la neumolisina en el extremo 3' del gen de la neumolisina. Los cebadores amplifican un ADN de 1413 pares de bases que codifica 471 aminoácidos de la longitud total de la proteína neumolisina. La siguiente es la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la neumolisina de tipo 19A de *S. pneumoniae*:

**MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKKRSLSTNT  
SDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLAVDRAPMTYSIDLPLGLASSDSFLQV  
EDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGQVNNVPARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFE  
KTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDAVKNPGDVFQDQDTVTVEDLKQRG  
ISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSKSDEVEAAFEALIKGVKVPQTEWKQILDNT  
EVKAVILGGDPSSGARVVTGKVDMMVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTTTSFLRDNVVA  
TFQNSTDYVETKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAW  
DRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWWRVYEKTDLPLVRKRTIS  
IWGTTLYPQVEDKVEND (SEQ ID NO:1).**

(SEC ID N.º: 1).

35 La PCR se realizó sustancialmente del siguiente modo: 1 ciclo a 94 °C durante 4 minutos; 30 ciclos a 94 °C durante 1 minuto, a 55 °C durante 1 minuto y a 72 °C durante 1,5 minutos; y 1 ciclo a 72 °C durante 10 minutos. El fragmento de ADN sintetizado por PCR se digirió con las enzimas de restricción NdeI y BamHI y se ligó al vector de expresión pET11b (para generar pSA-14). El ADN recombinante se introdujo en células DE3 de *E. coli* por transformación. Se seleccionaron las transformantes resistentes a la ampicilina. La presencia del inserto se confirmó mediante la digestión con las enzimas de restricción NdeI y BamHI.

40 Los fragmentos de ADN amplificados carecían de nucleótidos en el extremo 3' en comparación con la secuencia genómica natural. Muchos de los polipéptidos de la seudoneumolisina codificados por dichos ácidos nucleicos modificados resultaron ser no hemolíticos y no citotóxico, pero conservan la capacidad inmunógena.

#### A. Construcción del vector de expresión pSA-1

50 El vector de expresión pSA-1 codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 460 de la proteína neumolisina de SEC ID N.º: 1. Se realizó la PCR en ADN cromosómico del tipo 19A de *S. pneumoniae* utilizando los

cebadores LSYN-1 (5'-GACTAGATCTCCATATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 2) y LSYN-4 5'-GACTGGATCCTTACTAGAGAGTTGTTCCCAAATAG-3'; SEC ID N.º: 5) para amplificar un ADN de 1380 pares de bases.

- 5 El fragmento de ADN sintetizado por PCR se digirió con NdeI y BamHI y se ligó a los sitios NdeI y BamHI del vector de expresión pET11b para generar pSA-1. El ADN recombinante se introdujo en células DE3 de *E. coli* por transformación. Se seleccionaron las transformantes resistentes a la ampicilina. Se confirmó la presencia del inserto mediante digestión con las enzimas de restricción NdeI y BamHI, y se confirmó además por secuenciación del ADN.
- 10 El polipéptido de 460 aminoácidos codificado, que carece de los 11 aminoácidos presentes en el extremo carboxiterminal de la proteína de la neumolisina natural, presenta la secuencia siguiente:

**MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKKRSLSTNT  
SDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLENNPTLLAVDRAPMTYSIDLPLGLASSDSFLQV  
EDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGQVNNVPARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFE  
KTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDVAVKNPGDVFQDQDTVTVEDLKQRG  
ISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSSKSDEVEAAFEALIKGVKVPQTEWKQILDNT  
EVKAVILGGDPSSGARVVTGKVDMMVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTTSSFLRDNVVA  
TFQNSTDYVETKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAW  
DRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWWRVYEKTDLPLVRKRTIS  
IWGTTL (amino acids 1-460 of SEQ ID NO:1).**

(aminoácidos 1 a 460 de la SEC ID N.º: 1).

- 15 B. Construcción del vector de expresión pSA-49
- El vector de expresión pSA-49 codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 464 de la proteína neumolisina de SEC ID N.º: 1. Se realizó la PCR en ADN cromosómico del tipo 19A de *S. pneumoniae* usando los
- 20 cebadores LSYN-1 (5'-GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 2) y LSYN-54 (5'-CTGAGGATCCTTACTATACCTGAGGATAGAGAGTTGTTTC-3'; SEC ID N.º: 25) para amplificar un ADN de 1392 pares de bases.

- 25 El fragmento de ADN sintetizado por PCR se digirió con NdeI y BamHI y se ligó a los sitios NdeI y BamHI del vector de expresión pET11b para generar pSA-49. El ADN recombinante se introdujo en células DE3 de *E. coli* por transformación. Se seleccionaron las transformantes resistentes a la ampicilina. Se confirmó la presencia del inserto mediante digestión con las enzimas de restricción NdeI y BamHI, y se confirmó además por secuenciación del ADN.

- 30 El polipéptido de 464 aminoácidos codificado, que carece de los 7 aminoácidos presentes en el extremo carboxiterminal de la proteína de la neumolisina natural, presenta la secuencia siguiente:

**MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKKRSLSTNT  
SDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLENNPTLLAVDRAPMTYSIDLPLGLASSDSFLQV  
EDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGQVNNVPARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFE  
KTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDVAVKNPGDVFQDQDTVTVEDLKQRG  
ISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSSKSDEVEAAFEALIKGVKVPQTEWKQILDNT  
EVKAVILGGDPSSGARVVTGKVDMMVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTTSSFLRDNVVA  
TFQNSTDYVETKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAW  
DRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWWRVYEKTDLPLVRKRTIS  
IWGTTLYPQV (amino acids 1-464 of SEQ ID NO:1).**

(aminoácidos 1 a 464 de la SEC ID N.º: 1).

C. Construcción del vector de expresión pSA-11

5 El vector de expresión pSA-11 codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 466 de la proteína neumolisina de SEC ID N.º: 1. Se realizó la PCR en ADN cromosómico del tipo 19A de *S. pneumoniae* usando los cebadores LSYN-1 (5'-GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 2) y LSYN-17 (5'-GACTGGATCCTTACTAATCTTCTACCTGAGGATAG-3'; SEC ID N.º: 6) para amplificar un ADN de 1398 pares de bases.

10 El fragmento de ADN sintetizado por PCR mostrado se digirió con NdeI y BamHI y se ligó a los sitios NdeI y BamHI del vector de expresión pET11b para generar pSA-11. El ADN recombinante se introdujo en células DE3 de *E. coli* por transformación. Se seleccionaron las transformantes resistentes a la ampicilina. Se confirmó la presencia del inserto mediante digestión con las enzimas de restricción NdeI y BamHI, y se confirmó además por secuenciación del ADN.

15 El polipéptido de 466 aminoácidos codificado, que carece de los 5 aminoácidos presentes en el extremo carboxiterminal de la proteína de la neumolisina natural, presenta la secuencia siguiente:

**MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKKRSLSTNT  
SDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLAVDRAPMTYSIDLPGGLASSDSFLQV  
EDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGQVNNVPPARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFE  
KTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDVAVKNPBGDVFQDVTVEDLKQRG  
ISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSSKSEVEAAFEALIKGVKVAPQTEWKQILDNT  
EVKAVILGGDPSSGARVVTGKVDMVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTTSFRLRDNVVA  
TFQNSTDYVETKVTAAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGEVLTPKAW  
DRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWWWRTVYEKTDLPLVRKRTIS  
IWGTTLYPQVED (amino acids 1-466 of SEQ ID NO:1).**

20 (aminoácidos 1 a 466 de la SEC ID N.º: 1).

D. Construcción del vector de expresión pSA-32

25 El vector de expresión pSA-32 codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 469 de la proteína neumolisina de SEC ID N.º: 1. Se realizó la PCR en ADN cromosómico del tipo 19A de *S. pneumoniae* usando los cebadores LSYN-1 (5'-GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 2) y LSYN-37 (5'-GACTGGATCCTTACTATTCTACCTTATCTTCTACCTGAG-3'; SEC ID N.º: 7) para amplificar un ADN de 1407 pares de bases.

30 El fragmento de ADN sintetizado por PCR se digirió con NdeI y BamHI y se ligó a los sitios NdeI y BamHI del vector de expresión pET11b para generar pSA-32. El ADN recombinante se introdujo en células DE3 de *E. coli* por transformación. Se seleccionaron las transformantes resistentes a la ampicilina. Se confirmó la presencia del inserto mediante digestión con las enzimas de restricción NdeI y BamHI, y se confirmó además por secuenciación del ADN.

35 El polipéptido de 469 aminoácidos codificado, que carece de los 2 aminoácidos presentes en el extremo carboxiterminal de la proteína de la neumolisina natural, presenta la secuencia siguiente:

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKKRSLSTNT  
 SDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLAVDRAPMTYSIDLPGGLASSDSFLQV  
 EDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGQVNNV PARMQYEKIT AHSMEQLKVKFGSDFE  
 KTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDAVKNP GDVFQDTVTVEDLKQRG  
 ISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSKSDEVEAAFEALIKGVKVAPQTEWKQILDNT  
 EVKAVILGGDPSSGARVVTGKVD MVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTT SFLRDNVVA  
 TFQNSTDYVETKVTA YRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAW  
 DRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWWR TVYEKTDLPLVRKRTIS  
 IWGTTLYPQVEDKVE (amino acids 1-469 of SEQ ID NO:1).

(aminoácidos 1 a 469 de la SEC ID N.º: 1).

E. Construcción del vector de expresión pSA-31

5 El vector de expresión pSA-31 codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 470 de la proteína neumolisina de SEC ID N.º: 1. Se realizó la PCR en ADN cromosómico del tipo 19A de *S. pneumoniae* usando los cebadores LSYN-1 (5'-GACTAGATCTCCATATGGCAAATAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 2) y LSYN-38 (5'-GACTGGATCCTACTAATTTTCTACCTTATCTTCTACCTGAG-3'; SEC ID N.º: 8) para amplificar un ADN de 1410  
 10 pares de bases.

15 El fragmento de ADN sintetizado por PCR se digirió con NdeI y BamHI y se ligó a los sitios NdeI y BamHI del vector de expresión pET11b para generar pSA-31. El ADN recombinante se introdujo en células DE3 de *E. coli* por transformación. Se seleccionaron las transformantes resistentes a la ampicilina. Se confirmó la presencia del inserto mediante digestión con las enzimas de restricción NdeI y BamHI, y se confirmó además por secuenciación del ADN.

El polipéptido de 470 aminoácidos codificado, que carece de 1 aminoácido presente en el extremo carboxiterminal de la proteína de la neumolisina natural, presenta la secuencia siguiente:

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKKRSLSTNT  
 SDISVTATNDSRLYPGALLVVDETLLENNPTLLAVDRAPMTYSIDLPGGLASSDSFLQV  
 EDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGQVNNV PARMQYEKIT AHSMEQLKVKFGSDFE  
 KTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDAVKNP GDVFQDTVTVEDLKQRG  
 ISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSKSDEVEAAFEALIKGVKVAPQTEWKQILDNT  
 EVKAVILGGDPSSGARVVTGKVD MVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTT SFLRDNVVA  
 TFQNSTDYVETKVTA YRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGKEVLTPKAW  
 DRNGQDLTAHFTTSIPLKGNVRNLSVKIRECTGLAWEWWR TVYEKTDLPLVRKRTIS  
 IWGTTLYPQVEDKVEN (amino acids 1-470 of SEQ ID NO:1).

(aminoácidos 1 a 479 de la SEC ID N.º: 1).

Ejemplo 2: expresión, purificación y caracterización de polipéptidos deseudoneumolisina recombinante

25 Se clonaron los productos de la PCR en vectores de expresión pET, tal como se describe en el ejemplo 1. Se transformó el ADN recombinante en *E. coli* y se seleccionaron los transformantes en placas que contenían antibióticos. Se confirmaron las secuencias de ADN introducidas por secuenciación del ADN. Se cultivó la *E. coli* recombinante a 37 °C durante la noche y se añadió al cultivo isopropiltio-β-D-galactósido (IPTG) como inductor, y se cultivaron las células de un modo continuo durante tres horas. Se analizó el polipéptido recombinante expresado  
 30 mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie. Se purificaron los

polipéptidos recombinantes utilizando cromatografía de afinidad y se analizó la actividad hemolítica con un ensayo de hemólisis utilizando eritrocitos humanos o de oveja (tal como se detalla en el ejemplo 3).

**Ejemplo 3: determinación de la actividad hemolítica de los polipéptidos deseudoneumolisina**

Se determinó la actividad hemolítica de los polipéptidos codificados según el protocolo siguiente.

- 1) Se prepara una suspensión al 2% de eritrocitos humanos o de oveja. Se añaden 0,2 ml de células sanguíneas recién extraídas a 10 ml de PBS (pH 7,2). Se hace girar la suspensión a 3000 rpm durante 30 segundos y se vuelve a suspender el sedimento en 10 ml de PBS tres veces.
- 2) Se añade 1 µg de polipéptido en 0,5 ml de PBS (pH 7,2) y se mezcla con 0,5 ml de lavado de suspensión de RBC al 2%.
- 3) Se incuba la mezcla a 37 °C durante 1 hora y luego se centrifuga a 10.000 rpm durante 2 min en una microcentrífuga Eppendorf.
- 4) Se determina la densidad óptica (DO) a 541 nm. La actividad hemolítica se midió como el porcentaje de absorción de la DO en comparación con el polipéptido de la neumolisina de longitud total.

Tal como se representa en la tabla 1, las formas truncadas de la neumolisina que carecen de los aminoácidos carboxiterminales 7, 6, 2, o 1, carecían de actividad hemolítica. Se demostró que una forma truncada que carecía de los aminoácidos carboxiterminales 5 presentaba una pérdida parcial de la actividad hemolítica.

Tabla 1: actividad hemolítica de la neumolisina de longitud total y de la seudoneumolisina

Constructo	Parte de la neumolisina (a)	% de actividad hemolítica (b)
pSA-14	1-471 (neumolisina de longitud total)	100
pSA-49	1-464 (seudoneumolisina de -7 aa)	0
pSA-48	1-465 (seudoneumolisina de -6 aa)	0,2
pSA-11	1-466 (seudoneumolisina de -5 aa)	17
pSA-34	1-467 (seudoneumolisina de -4 aa)	100
pSA-33	1-468 (seudoneumolisina de -3 aa)	100
pSA-32	1-469 (seudoneumolisina de -2 aa)	0
pSA-31	1-470 (seudoneumolisina de -1 aa)	1,8

(a) Los números representan los aminoácidos (aa) del polipéptido natural de neumolisina ausentes en la forma truncada en la región carboxiterminal.  
 (b) Las actividades hemolíticas de las formas truncadas en la región carboxiterminal se expresan como porcentaje del constructo de longitud total, pSA-14.

**Ejemplo 4: preparación de conjugados de polisacárido y proteína**

A. Oxidación del polisacárido

Los polisacáridos capsulares neumocócicos, tales como los 4, 6B, 9V, 14, 18, 19F y 23F, se adquirieron en American Type Culture Collection (Manassas, VA). Se disolvieron 10 mg de polisacárido en 1 ml de agua destilada a 4 °C durante la noche. Al día siguiente se añadió un ml de PBS 0,2 M (pH 7,2). Se oxidó el polisacárido por reacción con peryodato de sodio 2 mM (PM: 213,9, Sigma) en oscuridad durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de peryodato de sodio mediante la reacción con etilenglicol (PM: 62,07) a una concentración final de 25 mM. La mezcla de reacción que contenía el polisacárido se dializó extensamente tres veces en 1000 ml de PBS 0,1 M (pH 7,2).

B. Preparación de la columna de inmunoafinidad

(i) Purificación de la Neumolisina de longitud total marcada con His

Se cultivó *E. coli* (pET24b que contenía neumolisina marcada con C-His) 4 ml de medio LB que comprendía 40 µl de glucosa al 20% y 4 µl de 50 mg/ml de kanamicina y se incubó a 37 °C durante la noche con agitación constante a 160 rpm. Se transfirieron tres ml del cultivo nocturno a 100 ml de medio LB que contenía 1 ml de glucosa al 20% y 100 µl de 50 mg/ml de kanamicina y se incubó a 37 °C con agitación constante a 160 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,4 a 0,5. Se añadieron 400 µl de IPTG 1 M a 100 ml de cultivo con una concentración final de 4 mM de IPTG. Se cosecharon las células, 3 horas después de provocar la expresión génica, mediante centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos. Se purificó la neumolisina de longitud total marcada con His según el protocolo del sistema de purificación ProBond proporcionado por Invitrogen (Carlsbad, CA).

(ii) Producción de anticuerpos policlonales contra la neumolisina marcada con His

Se procedió a la inyección de conejos blancos Nueva Zelanda con 4 dosis iguales de 25 mg cada una, en 4 sitios diferentes de neumolisina marcada con His emulsionada y el aditivo TiterMax (400 µl de 1 mg/ml de neumolisina marcada con His y 400 µl de aditivo TiterMax); uno en cada músculo del muslo (i.m.) y uno por vía subcutánea (s.c.) en cada lado de la columna vertebral en los músculos longitudinales de la espalda. Tras 14 días, se recogieron 5 ml de sangre de los conejos a través de las venas de las orejas.

Si los valores de los anticuerpos del suero alcanzaron unos niveles de dilución de 1:3000, se sacrificaron los animales por hemorragia. Si los valores de los anticuerpos eran inferiores a 1:3000, se inyectó una segunda dosis de antígeno y se analizaron los animales una semana más tarde (7 días después de la segunda dosis). Se continuaron los ciclos hasta alcanzar unos valores adecuados.

#### (iii) Purificación de IgG de conejo utilizando medio de agarosa con proteína A Affi-Gel

El suero de un conejo inmunizado con neumolisina marcada con His se aplicó a una columna de proteína A Affi-Gel equilibrada con fosfato de sodio 10 mM y NaCl 150 mM (pH 8,2). Tras lavar con 10 volúmenes de lecho, se eluyeron las inmunoglobulinas con de 2 a 5 volúmenes de citrato sódico 100 mM (pH 3,0). Se recogió la IgG eluida, se mezcló y se determinó la DO a 280. A continuación se aplicaron tres ml de IgG purificada a la columna 10 DG y se eluyeron los tres primeros ml de la columna. Se añadieron a la columna 3,5 ml de disolución amortiguadora de acoplamiento, (NaCl 150 mM y acetato sódico 100 mM, pH 5,5) o 0,1 M de disolución amortiguadora de ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS). Se recogieron 3,5 ml de eluyente IgG, se mezclaron y a continuación se acoplaron a Affi-Gel Hz o a Affi-Gel10.

#### (iv) Preparación de la columna de inmutafinidad utilizando IgG de acoplamiento aleatorio con Affi-Gel10

El Affi-Gel 10 comprende ésteres de N-hidroxisuccinimida de un soporte de perlas de gel de agarosa reticulado secundario y se acopla con todos los ligandos mediante aminas primarias. Para el acoplamiento con la IgG, se transfirió el Affi-Gel 10 a un tubo de 15 ml y se lavó tres veces con DDH<sub>2</sub>O fría y dos veces con disolución amortiguadora de MOPS 0,1 M (pH 7,0) fría. Se añadió IgG purificada a un tubo de 15 ml que contenía Affi-Gel 10 prelavado y se giró por el interior a 4 °C durante cuatro horas. Los ésteres activos restantes de Affi-Gel 10 se bloquearon añadiendo Tris HCl 100 mM, pH 8,0, durante otras 0,5 horas a 4 °C. Se transfirió el gel a una columna de 1,5 x 9,0 cm. Se recogió el eluyente de la columna y se determinó la DO a 280. Se lavó la columna de inmutafinidad Affi-Gel 10 con dos volúmenes de lecho de NaCl 0,5 M y Tris HCl 25 mM (pH 8,0). Se recogió de nuevo el eluyente de la columna y se determinó la DO a 280. Basándose en la concentración de IgG total y la IgG desacoplada se calculó la eficiencia de acoplamiento.

#### (v) Examen de las columnas de inmutafinidad

Para analizar las columnas de inmutafinidad, se añadieron las fracciones con seudoneumolisina de la cromatografía de DEAE-sefarosa a Tris HCl 25 mM (pH 8,0), NaCl 0,5 M y Triton X-100 al 0,5%. La muestra se aplicó a 6,5 ml de la columna Affi-Gel 10 (1,5 x 12 cm) equilibrada con NaCl 0,5 M y Tris HCl 25 mM (pH 8,0) con un caudal de 1 ml/2 min. Se recogió la fracción de flujo continuo. Se lavó la columna de dos a tres veces con 15 ml de NaCl 0,5 M y Tris HCl 25 mM (pH 8,0). Se lavó de nuevo la columna con 5 ml de urea 4 M. La proteína seudoneumolisina enlazada se eluyó dos veces con 7 ml de urea 4 M. Las muestras proteicas de los primeros 7 ml de las fracciones de urea 4 M se analizaron mediante SDS-PAGE al 9% y se visualizaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-20.

### C. Preparación de la proteína seudoneumolisina recombinante

Se cultivaron bacterias transformadas con el vector de expresión de pSA-49 (que codifica un polipéptido que carece de los 7 aminoácidos de la región carboxiterminal de la neumolisina; véase el ejemplo 1) en un tubo de 50 ml que contenía 30 ml de medio LB con 100 mg/ml de ampicilina a 37 °C durante la noche. A la mañana siguiente, se inocularon 400 ml de medio LB con 100 µg/ml de ampicilina y glucosa al 0,2% en un matraz de 1 litro con 13 ml del cultivo nocturno y se procedió a la incubación con agitación a 37 °C. A una densidad celular correspondiente a una A600 de 0,5, se provocó la expresión de la proteína seudoneumolisina añadiendo IPTG 2 o 4 mM durante 3 horas.

Las bacterias se centrifugaron en un tubo de centrífuga de 500 ml a 6500 rpm durante 10 minutos. El sedimento bacteriano se volvió a suspender en 40 ml de disolución amortiguadora Tris HCl (pH 8,0) con 100 µg/ml de lisozima, se incubó en hielo durante 15 minutos, y se sometió 3 veces a ultrasonidos con ráfagas de 10 segundos sobre hielo. Se congeló el lisado se congeló a -80 °C durante 10 min y se descongeló a 37 °C durante 5 min. Se trató el lisado celular mediante sonicación-congelación-descongelación dos veces más. Se eliminaron los restos celulares insolubles por centrifugación a 6000 rpm durante 20 minutos. A continuación se pasó el lisado sobrenadante a través de un filtro de 0,8 µM. Se examinó el flujo a través de las proteínas mediante un análisis con SDS PAGE al 9% y se visualizó con una tinción con azul brillante Coomassie R-250. Se continuó purificando el lisado bruto mediante cromatografía en DEAE-sefarosa.

Se cargaron veinte ml de lisado bacteriano bruto en una columna (5 x 12 cm) con DEAE-Sefarosa equilibrada con Tris-HCl 25 mM (pH 8,0). Una vez se hubo recogido el primer flujo continuo, se añadieron 10 ml de Tri-HCl 25 mM a la columna. Se recogieron 10 ml de flujo continuo y se mezclaron con la primera fracción de flujo continuo (fracción 1). A continuación, se aplicaron 35 ml de Tris-HCl 25 mM (pH 8,0) y se recogió el flujo continuo (fracción 2). Se aplicaron otros 35 ml de Tris-HCl 25 mM (pH 8,0) y se recogió de nuevo el flujo continuo (fracción 3). Se eluyeron las proteínas bacterianas unidas con NaCl 4 M y Tris HCl 25 mM (fracción 4). Se determinó la concentración proteica de cada fracción leyendo la DO a 280 nm. Se analizaron las muestras de proteínas por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 9% (SDS-PAGE) y se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie R-20. Se continuaron purificando las fracciones (1 y 2) del flujo continuo que contienenseudoneumolisina mediante cromatografía de inmunoafinidad.

Tras la cromatografía de DEAE-sefarosa, se añadieron las fracciones conseudoneumolisina a Tris HCl 25 mM (pH 8,0), NaCl 0,5 M y Triton X-100 al 0,5%. La muestra se aplicó a 6,5 ml de la columna Affi-Gel 10 acoplada a la IgG antineumolisina de conejo (1,5 x 12 cm) equilibrada con NaCl 0,5 M y Tris HCl 25 mM (pH 8,0) con un caudal de 1 ml/2 min. Se recogió la fracción de flujo continuo. Se lavó la columna dos a tres veces con 15 ml de NaCl 0,5 M y Tris HCl 25 mM (pH 8,0). Se lavó de nuevo la columna con 5 ml de urea 4 M. La proteínaseudoneumolisina enlazada se eluyó dos veces con 7 ml de urea 4 M. Las muestras proteicas de las fracciones enlazadas y sin enlazar se analizaron mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie R-20.

Tras la cromatografía de inmunoafinidad, se continuó purificando la fracción eluida de urea 4 M que conteníaseudoneumolisina mediante cromatografía 10 DG para eliminar la urea. Se aplicó una muestra de 3,0 ml a una columna 10 DG (1,5 x 12 cm) equilibrada con una disolución amortiguadora 1 x PBS. Se descartaron los primeros 3,0 ml del flujo continuo. Se añadieron a la columna 3,9 ml de disolución amortiguadora 1 x PBS. Se determinó la DO a 280 de la fracción de 3,9 ml recogida de la columna y se recogieron las fracciones proteicas. Se analizó la pureza de la proteína mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 9%.

**D. Preparación de conjugados de polisacárido y proteína**

Se conjugaron dos miligramos del polisacárido 18C de *S. pneumoniae* con la proteínaseudoneumolisina (tal como se ha descrito en la sección C anterior) mediante la conjugación directa utilizando un ensayo de aminación reductora. Se añadieron 10 mg deseudoneumolisina en PBS 0,1 M a la mezcla de la reacción del polisacárido oxidado y se procedió a la incubación a temperatura ambiente con agitación suave durante 30 min. Se añadió cianoborohidruro sódico a la concentración final de 20 mM (por ejemplo, se añadieron 750 µl de cianoborohidruro 100 mM a 3 ml de polisacárido oxidado y la mezcla deseudoneumolisina). Se incubó la mezcla a temperatura ambiente con agitación suave durante 5 días. Se precipitó el conjugado a 9.000 rpm durante 10 minutos y a continuación se disolvió en 1 a 2 ml de PBS 0,1 M, pH 7,2. Se sometió la mezcla a cromatografía en columna de sefarosa CL-4B (1,5 x 100 cm) equilibrada con 1 x PBS, pH 7,2. Se mezclaron las fracciones que contenían proteína y polisacárido y se concentraron mediante un Amicon Centricon-30 (corte de peso molecular 30.000) y se analizaron a continuación con respecto al contenido de proteína y polisacárido.

**Ejemplo 5: respuesta de los anticuerpos de ratones al conjugado de polisacárido y proteína**

Los conjugados de los polisacáridos 14, 18C, 19F, 23F, 4, 6B y 9V de *S. pneumoniae* y la proteínaseudoneumolisina preparados tal como se ha descrito en el ejemplo 4 se analizaron para determinar su capacidad de producir anticuerpos contra el polisacárido y la neumolisina en ratones. Los conjugados, 0,3, 1, 3 µg/dosis de polisacárido mezclado con hidróxido de aluminio como aditivo (0,1 mg/dosis), se inyectaron por vía intraperitoneal a grupos de hembras de ratones NIH Swiss. En algunos experimentos, el segundo grupo de ratones recibió 1 µg de polisacárido y/o el tercer grupo de ratones recibió 1 µg deseudoneumolisina. Los ratones recibieron dos dosis de recuerdo a intervalos de dos semanas. Siete días después de la inyección final, se determinaron los niveles en suero de anticuerpos antipolisacárido y de anticuerpos antineumolisina. La Tabla 2 es un sumario de los conjugados específicos administrados y de las respuestas inmunitarias medidas en los experimentos descritos en cada una de las figuras 1 a 14.

Tabla 2: sumario de los conjugados administrados y de los anticuerpos detectados en experimentos de inmunización con ratones

Número de la figura	Serotipo del componente polisacárido de <i>S. pneumoniae</i> del conjugado	Respuesta medida de los anticuerpos
1	14	anticuerpo IgG antineumolisina
2	14	anticuerpo IgG antipolisacárido del serotipo 14
3	18C	anticuerpo IgG antineumolisina
4	18C	anticuerpo IgG antipolisacárido del serotipo 18C
5	19F	anticuerpo IgG antineumolisina

6	19F	anticuerpo IgG antipolisacárido del serotipo 19F
7	23F	anticuerpo IgG antineumolisina
8	23F	anticuerpo IgG antipolisacárido del serotipo 23F
9	4	anticuerpo IgG antineumolisina
10	4	anticuerpo IgG antipolisacárido del serotipo 4
11	6B	anticuerpo IgG antineumolisina
12	6B	anticuerpo IgG antipolisacárido del serotipo 6B
13	9V	anticuerpo IgG antineumolisina
14	9V	anticuerpo IgG antipolisacárido del serotipo 9V

En las leyendas de las figuras 1 a 14 se utilizan las siguientes abreviaturas: disolución salina amortiguadora de fosfato ("PBS"); conjugados ("C"); aditivo de hidróxido de aluminio ("A"); y seudoneumolisina ("PPN").

5 Los ratones inmunizados con el conjugado de polisacárido y seudoneumolisina presentaron una inducción de anticuerpos que reaccionaron mediante la prueba ELISA con la neumolisina natural marcada con His. En todos los grupos que recibieron el conjugado y el aditivo, los niveles de anticuerpos antineumolisina y antipolisacárido fueron significativamente superiores a los del grupo de control con PBS y aditivo ( $p < 0,001$ , prueba t). El suero de los ratones a los que se administró el conjugado presentó inesperadamente unos valores elevados de anticuerpos antineumolisina y antipolisacárido, con unos factores de dilución en suero de 76.800 y 9.600, respectivamente, en comparación con el de los ratones a los que se administró únicamente PBS. Se observaron los niveles más elevados de anticuerpos antineumolisina y antipolisacárido en los ratones a los que se administraron 3,0 mg del conjugado de polisacárido y seudoneumolisina (figuras 1 a 14). Los niveles de anticuerpos antineumolisina resultaron más elevados en los grupos a los que se administró el conjugado de polisacárido y seudoneumolisina con aditivo, en comparación con el grupo de seudoneumolisina con aditivo (figura 3) o el grupo seudoneumolisina sin aditivo (figura 6).

Las tablas 3 y 4 muestran cómo los ratones a los que se administraron 3,0 µg del conjugado presentaron el mayor porcentaje que respondió bien al tratamiento. Dichos resultados indican que la efectividad de la vacuna antineumocócica se puede mejorar mediante el conjugado de polisacárido con una proteína seudoneumolisina. Además de la respuesta de los anticuerpos, se examinaron la inmunidad protectora cruzada y la eliminación de bacterias en los ratones a los que se administraron las vacunas conjugadas (véase el ejemplo 8).

Tabla 3: porcentaje de ratones con respuesta positiva contra el polisacárido 18C

Grupos de ratones	Porcentaje que respondió bien al tratamiento
Aditivo de hidróxido de aluminio	0 %
1 µg de seudoneumolisina (PPN)	0 %
1 µg de polisacárido 18C (PS) + aditivo	0 %
0,3 µg de conjugado de (PS) 18C y PPN + aditivo	60 %
1,0 µg de conjugado de (PS) 18C y PPN + aditivo	75 %
3,0 µg de conjugado de (PS) 18C y PPN + aditivo	100 %
1,0 µg de conjugado de (PS) 18C y PPN sin aditivo	20 %

Nota: se determinaron las respuestas positivas utilizando una dilución 1:100 de muestras de suero de todos los ratones. Una lectura óptica a 405 nm superior a 0,05 indica una respuesta positiva.

Tabla 4: Porcentaje de ratones con respuesta positiva contra el polisacárido 14

Grupos de ratones tratamiento	Porcentaje que respondió bien al
Aditivo de hidróxido de aluminio	0 %
1 µg de seudoneumolisina (PPN)	0 %
1 µg de polisacárido 14 (PS) + aditivo	0 %
0,3 µg de polisacárido (PS) 14 y PPN + aditivo	100 %
1,0 µg de polisacárido (PS) 14 y PPN + aditivo	100 %
3,0 µg de polisacárido (PS) 14 y PPN + aditivo	100 %

Nota: Se determinaron las respuestas positivas utilizando una dilución 1:300 de muestras de suero de todos los ratones. Una lectura óptica a 405 nm superior a 0,12 indica una respuesta positiva.

La figura 15 es un gráfico que representa la respuesta de los anticuerpos en ratones contra el polisacárido del serotipo 14 7 días después de la tercera inyección del conjugado del polisacárido del serotipo 14 y la seudoneumolisina. En la figura 15, G1, G2, y G3 son grupos de ratones inyectados con 0,3 µg, 1,0 µg y 3,0 µg por ratón de la vacuna conjugada, respectivamente. G4 representa ratones que a los que se inyectó 1,0 µg del polisacárido del serotipo 14 solo. G5 y G6 son grupos de ratones inyectados con 1,0 y 3,0 µg de seudoneumolisina sola, respectivamente. G7 es el grupo de ratones inyectados con 1,0 µg de la vacuna conjugada de polisacárido del serotipo 14 y seudoneumolisina sin aditivo. Se observó un nivel reducido o nulo de respuesta de los anticuerpos contra el polisacárido en ratones de G4, G5 y G6.

#### 10 **Ejemplo 6: construcción de vectores de expresión para la seudoneumolisina, la autolisina antineumocócica y las vacunas de ADN de proteínas de superficie neumocócica.**

##### A. Vector pVAX1 para la construcción de una vacuna de ADN

15 El vector pVAX1 (Invitrogen) se diseñó específicamente para utilizarlo en el desarrollo de vacunas de ADN. Su construcción cumple con el documento de la Agencia Estadounidense del Medicamento (FDA), *Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications* ("Puntos a considerar en las vacunas de ADN plasmídico para indicaciones preventivas de enfermedades infecciosas"), publicado el 22 de diciembre 1996.

##### 20 B. Clonación y expresión de la seudoneumolisina

Se realizó la PCR utilizando perlas de PCR Ready-to-go (Amersham Pharmacia Biotech Inc. de Piscataway, NJ) que contienen los cebadores y el ADN cromosómico plantilla neumocócica 19A. Se realizó la PCR del siguiente modo: 94 °C, 4 minutos para 1 ciclo; 94 °C, 1 minuto; 55 °C, 1 minuto; 72 °C, 1,5 minutos para 30 ciclos; y 72 °C, 10 minutos para 1 ciclo.

El producto de la PCR amplificado se digirió con enzimas de restricción y se ligó en sitios del vector pVAX1 para generar pSA-8, pSA-45, pSA-12, pSA-42 y pSA-41. El ADN recombinante se introdujo en células DH5α de *E. coli* mediante transformación y se verificó por digestión con enzimas de restricción. El gen introducido se analizó por secuenciación del ADN. La transcripción y traducción in vitro se realizaron con el kit de TNT según el protocolo del fabricante (Promega, Madison, WI) para confirmar la expresión del gen introducido.

El vector de expresión pSA-8 codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 460 de la proteína neumolisina de SEC ID N.º: 1. El inserto se generó tal como se describió anteriormente utilizando el cebador LSYN-15 (5'-GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 4) y el cebador LSYN-4 (5'-GACTGGATCCTTAGAGAGTTGTTCCCAAATAG-3'; SEC ID N.º: 5) para amplificar el ADN de 1380 pares de bases. A continuación, el producto de la PCR de 1380 par de bases se restringió con NheI y BamHI y se ligó a los sitios NheI y BamHI del vector pVAX1 para generar pSA-8.

El vector de expresión pSA-45 codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 464 de la proteína neumolisina de SEC ID N.º: 1. El inserto se generó utilizando el cebador LSYN-15 (5'-GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 4) y LSYN-105 (GACTGGATCCCTATACCTGAGGATAGAGATTG; SEC ID N.º: 27). A continuación, el producto de la PCR de 1392 par de bases se restringió con NheI y BamHI y se ligó a los sitios NheI y BamHI del vector pVAX1 para generar pSA-45.

El vector de expresión pSA-12 codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 466 de la proteína neumolisina de SEC ID N.º: 1. El inserto se generó tal como se describió anteriormente utilizando el cebador LSYN-15 (5'-GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 4) y el cebador LSYN-17 (5'-GACTGGATCCTTACTAATCTTCTACCTGAGGATAG-3'; SEC ID N.º: 6) para amplificar el ADN de 1398 pares de bases. A continuación, el producto de la PCR de 1398 par de bases se restringió con NheI y BamHI y se ligó a los sitios NheI y BamHI del vector pVAX1 para generar pSA-12.

El vector de expresión pSA-42 codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 469 de la proteína neumolisina de SEC ID N.º: 1. El inserto se generó tal como se describió anteriormente utilizando el cebador LSYN-15 (5'-GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 4) y el cebador LSYN-37 primer (5'-GACTGGATCCTTACTATTCTACCTTATCTTCTACCTGAG-3'; SEC ID N.º: 7) para amplificar el ADN de 1407 pares de bases. A continuación, el producto de la PCR de 1407 par de bases se restringió con NheI y BamHI y se ligó a los sitios NheI y BamHI del vector pVAX1 para generar pSA-42.

El vector de expresión pSA-41 codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 470 de la proteína neumolisina de SEC ID N.º: 1. El inserto se generó tal como se describió anteriormente utilizando el cebador LSYN-15 (5'-GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 4) y el cebador LSYN-38 (5'-GACTGGATCCTTACTAATTTTCTACCTTATCTTCTACCTGAG-3'; SEC ID N.º: 8) para amplificar el ADN de 1410 pares de bases. A continuación, el producto de la PCR de 1410 par de bases se restringió con NheI y BamHI y se ligó a los sitios NheI y BamHI del vector pVAX1 para generar pSA-41.

Los ácidos nucleicos que contienen el dinucleótido citosina-guanina sin metilar ("CpG") en un contexto o motivo de secuencia particular, pueden ser estimuladores potentes de diversos tipos de células inmunitarias *in vitro*. Los oligonucleótidos sintéticos que contienen motivos CpG pueden activar directamente el sistema inmunitario congénito estimulando los linfocitos B para que proliferen y secreten inmunoglobulina, IL-6 e IL-10, los linfocitos citolíticos naturales para que produzcan IFN- $\gamma$ , y los monocitos y las células dendríticas para que produzcan IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$ . Un motivo de ADN que consiste en un dinucleótido CpG sin metilar flanqueado por dos purinas en 5' y dos pirimidinas en 3' estimula los linfocitos B para que produzcan IL-6 e IL-12, y estimula los linfocitos T CD4+ para que produzcan IL-6 e IFN- $\gamma$ .

El análisis de la estructura - función de la neumolisina ha demostrado que un dominio (que se encuentra en los aminoácidos 427 a 437) de la región carboxiterminal del polipéptido, que comprende una cisteína, resulta crítico para la citotoxicidad. Dicho motivo con cisteína está muy conservado entre los otros elementos de la familia de la citolisina activada con tiol. Diversas sustituciones de aminoácidos individuales dentro de dicho dominio reducen significativamente la citotoxicidad de la neumolisina. El siguiente constructo de ácido nucleico sustituye el motivo con cisteína por un motivo CpG introduciendo GAGCGTT en las posiciones nucleotídicas 1272 y 1274 de la neumolisina (mediante mutagenia dirigida). El ácido nucleico mutado que contiene la secuencia inmunoestimulante GAGCGTT es la siguiente:

**ATGGCAAATAAAGCAGTAAATGACTTTATACTAGCTATGAATTACGATAAAAAG  
 AAACCTCTTGACCCATCAGGGAGAAAGTATTGAAAATCGTTTCATCAAAGAGGGT  
 AATCAGCTACCCGATGAGTTTTGTTGTTATCGAAAGAAAGAAGCGGAGCTTGTCG  
 ACAAATACAAGTGATATTTCTGTAACAGCTACCAACGACAGTCGCCTCTATCCTG  
 GAGCACTTCTCGTAGTGGATGAGACCTTGTTAGAGAATAATCCCACTCTTCTTGC  
 GGTGATCGTGCTCCGATGACTTATAGTATTGATTTGCCTGGTTTGGCAAGTAGC  
 GATAGCTTTCTCCAAGTGGGAAGACCCCAGCAATTCAAGTGTTGCGGGAGCGGTA  
 AACGATTTGTTGGCTAAGTGGCATCAAGATTATGGTCAGGTCAATAATGTCCCAG  
 CTAGAATGCAGTATGAAAAAATCACGGCTCACAGCATGGAACAACCTCAAGGTCA  
 AGTTTGGTTCTGACTTTGAAAAGACAGGGAATTCTCTTGATATTGATTTTAACTCT  
 GTCCATTCAGGCGAAAAGCAGATTCAGATTGTTAATTTTAAGCAGATTTATTATA  
 CAGTCAGCGTAGATGCTGTTAAAAATCCAGGAGATGTGTTTCAAGATACTGTAA  
 CGGTAGAGGATTTAAAACAGAGAGGAATTTCTGCAGAGCGTCCTTTGGTCTATAT  
 TTCGAGTGTTGCTTATGGGCGCCAAGTCTATCTCAAGTTGGAAACCACGAGTAAG  
 AGTGATGAAGTAGAGGCTGCTTTTGAAGCTTTGATAAAAGGAGTCAAGGTAGCT  
 CCTCAGACAGAGTGGAACAGATTTTGGACAATACAGAAGTGAAGGCGGTTATT  
 TTAGGGGGCGACCCAAGTTCGGGTGCCCGAGTTGTAACAGGCAAGGTGGATATG**

GTAGAGGACTTGATTCAAGAAGGCAGTCGCTTTACAGCAGATCATCCAGGCTTG  
 CCGATTTTCTATACAACCTTCTTTTTTACGTGACAATGTAGTTGCGACCTTTCAAAA  
 TAGTACAGACTATGTTGAGACTAAGGTTACAGCTTACAGAAACGGAGATTTACT  
 GCTGGATCATAGTGGTGCCTATGTTGCCCAATATTATATTACTTGGAAATGAATTA  
 TCCTATGATCATCAAGGTAAGGAAGTCTTGACTCCTAAGGCTTGGGACAGAAAT  
 GGGCAGGATTTAACGGCTCACTTTACCACTAGTATTCCCTTTAAAAGGGAATGTTT  
 GTAATCTCTCTGTCAAATTAGAGAGCGTTCCGGGCTTGCCTGGGAATGGTGGCG  
 TACGGTTTATGAAAAACCGATTTGCCACTAGTGCGTAAAGCGGACGATTTCTATT  
 TGGGGAACAACCTCTATCCTCAGGTAGAAGATAAGGTAGAAAATGAC (SEQ ID  
 NO:9).

En otra forma de realización, se introdujo la secuencia de ADN inmunoestimulante GAGCGTT (mediante mutagenia dirigida al sitio) en las posiciones nucleotídicas 1272 a 1274 de un pseudoneumolisina que presentaba 33 nucleótidos eliminados en la región carboxiterminal. El ADN de la pseudoneumolisina con la secuencia inmunoestimulante es el siguiente:

5

ATGGCAAATAAAGCAGTAAATGACTTTATACTAGCTATGAATTACGATAAAAAG  
 AAACCTCTTGACCCATCAGGGAGAAAGTATTGAAAATCGTTTCATCAAAGAGGGT  
 AATCAGCTACCCGATGAGTTTGTGTTATCGAAAGAAAGAAGCGGAGCTTGTCG  
 ACAATAACAAGTGATATTTCTGTAACAGCTACCAACGACAGTCGCCTCTATCCTG  
 GAGCACTTCTCGTAGTGGATGAGACCTTGTTAGAGAATAATCCCACTCTTCTTGC  
 GGTCGATCGTGCTCCGATGACTTATAGTATTGATTTGCCTGGTTTGGCAAGTAGC  
 GATAGCTTTCTCCAAGTGGAAGACCCAGCAATCAAGTGTTTCGCGGAGCGGTA  
 AACGATTTGTTGGCTAAGTGGCATCAAGATTATGGTCAGGTCAATAATGTCCCAG  
 CTAGAATGCAGTATGAAAAAATCACGGCTCACAGCATGGAACAACCTCAAGGTCA  
 AGTTTGGTTCTGACTTTGAAAAGACAGGGAATTCTCTTGATATTGATTTTAACTCT  
 GTCCATTCAGGCGAAAAGCAGATTCAGATTGTTAATTTTAAGCAGATTTATTATA  
 CAGTCAGCGTAGATGCTGTTAAAAATCCAGGAGATGTGTTTCAAGATACTGTAA  
 CGGTAGAGGATTTAAAACAGAGAGGAATTTCTGCAGAGCGTCCTTTGGTCTATAT  
 TTCGAGTGTTGCTTATGGGCGCCAAGTCTATCTCAAGTTGGAAACCACGAGTAAG  
 AGTGATGAAGTAGAGGCTGCTTTTGAAGCTTTGATAAAAGGAGTCAAGGTAGCT  
 CCTCAGACAGAGTGGAAACAGATTTTGGACAATACAGAAGTGAAGGCGGTTATT  
 TTAGGGGGCGACCCAAGTTCGGGTGCCCGAGTTGTAACAGGCAAGGTGGATATG

GTAGAGGACTTGATTCAAGAAGGCAGTCGCTTTACAGCAGATCATCCAGGCTTG  
 CCGATTCCTATACAACTTCTTTTTTACGTGACAATGTAGTTGCGACCTTTCAAAA  
 TAGTACAGACTATGTTGAGACTAAGGTTACAGCTTACAGAAACGGAGATTTACT  
 GCTGGATCATAGTGGTGCCTATGTTGCCCAATATTATATTACTTGGAATGAATTA  
 TCCTATGATCATCAAGGTAAGGAAGTCTTGACTCCTAAGGCTTGGGACAGAAAT  
 GGGCAGGATTTAACGGCTCACTTTACCACTAGTATTCCTTTAAAAGGGAATGTTTC  
 GTAATCTCTCTGTCAAATTAGAGAGCGTTCCGGGCTTGCCTGGGAATGGTGGCG  
 TACGGTTTATGAAAAACCGATTTGCCACTAGTGCGTAAAGCGGACGATTTCTATT  
 TGGGGAACAACCTCTC (SEQ ID NO:10).

D. Clonación y expresión del gen autolisina neumocócico

5 El vector de expresión de pSA-59 codifica un polipéptido de 316 aminoácidos autolisina (Aly). El gen Aly del tipo 19A se amplificó por PCR utilizando perlas de PCR Ready-to-go que contenían cebadores y la plantilla de ADN cromosómico 19A neumocócico. Se realizó la PCR del siguiente modo: 94 °C, 4 minutos para 1 ciclo; 94 °C, 1 minuto; 50 °C, 1 minuto; 72 °C, 1 minuto, 15 segundos para 30 ciclos; y 72 °C, 10 minutos para 1 ciclo. El inserto se generó utilizando el cebador LSYN-74 (5'-GACTAAGCTTGCCACCATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAG-3'; SEC ID N.º: 11) y el cebador LSYN-89 (5'-CTGACTCGAGTTATTTACTGTAATCAAGCCATC-3'; SEC ID N.º: 12) para amplificar el ADN de 948 pares de bases.

15 El ADN sintetizado mediante la PCR se digirió con HindIII y XhoI y se ligó a los sitios HindIII y XhoI del pVAX1 para generar pSA-59 (Aly). El ADN recombinante se introdujo en células DH5α de *E. coli* mediante transformación y se verificó por digestión con enzimas de restricción, HindIII and XhoI. Se confirmó el inserto Aly por secuenciación del ADN. La transcripción y la traducción *in vitro* se realizaron con el kit de TNT (Promega, Madison, WI) según el protocolo del fabricante para confirmar la expresión de pSA-59.

20 La secuencia de ácido nucleico del inserto Aly pSA-59 es la siguiente:

ATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAGAACAGATTTGCCTCAAGTTGGCGTGCAA  
 CCATATAGGCAAGTACACGCACACTCAACTGGGAATCCGCATTCAACCGTACAG  
 AATGAAGCGGATTATCATTGGCGGAAAGACCCAGAATTAGGTTTTTTCTCGCACA  
 TTGTTGGGAACGGATGCATCATGCAGGTAGGACCTGTTAATAATGGTGCCTGGG

ACGTTGGGGGCGGTTGGAATGCTGAGACCTATGCAGCGGTTGAACTGATTGAAA  
 GCCATTCAACTAAAGAAGAGTTCATGACGGACTACCGCCTTTATATCGAACTCTT  
 ACGCAATCTAGCAGATGAAGCAGGTTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAGTTT  
 AGCTGGAATTAACGCACGAGTATTGCACGAATAACCAACCAACAACCACTC  
 AGACCATGTGGATCCATACCCTTACTTGGCAAAAATGGGGCATTAGCCGTGAGCA  
 GTTTAAGCATGATATTGAGAACGGCTTGACGATTGAAACAGGCTGGCAGAAGAA  
 TGACACTGGCTACTGGTACGTACATTCAGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTT  
 GAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGCTTGCAG  
 ACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAATTGGTACTACTTTGACCAATCAGGGC  
 AATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGAGAAGTGGTACTATTTCAACGAAG  
 AAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGACACTTGGTACTACTTAG  
 ACGCTAAAGAAGGCGCAATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGGACGGAA  
 CAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACTGGCAGACAAGCCAGAATTCA  
 CAGTAGAGCCAGATGGCTTGATTACAGTAAAA (SEQ ID NO:13).

La secuencia de ácido nucleico codificada por el inserto Aly pSA-59 es la siguiente:

MEINVSKLRDLPQVGVQPYRQVHAHSTGNPHSTVQNEADYHWRKDPELGFFSHIV  
 GNGCIMQVGPVNNGAWDVGGGWNAETYAAVELIESHSTKEEFMTDYRLYIELLRN  
 LADEAGLPKTLDTGSLAGIKTHEYCTNNQPNNHSDHVDPPYLAKWGISREQFKHDI  
 ENGLTIETGWQKNDTGYWYVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSSGYMLADRWRK  
 HTDGNWYYFDQSGEMATGWKKIAEKWYYFNEEGAMKTGWVVKYKDTWYYLDAK  
 EGAMVSNAFIQSADGTGWYYLKP DGT LADKPEFTVEPDGLITVK (SEQ ID NO:14).

E. Clonación y expresión del gen de la proteína A de superficie neumocócica (PspA) aminoterminal

El vector de expresión de pSA-60 codifica un polipéptido de 459 aminoácidos PspA. El gen PspA del tipo 19A se amplificó por PCR utilizando perlas de PCR Ready-to-go que contenían cebadores y la plantilla de ADN cromosómico 19A neumocócico. Se realizó la PCR del siguiente modo: 94 °C, 4 minutos para 1 ciclo; 94 °C, 1 minuto; 50 °C, 1 minuto; 72 °C, 1 minuto, 15 segundos para 30 ciclos; y 72 °C, 10 minutos para 1 ciclo. El inserto se generó utilizando el cebador LSYN-90 (5'-GACTAAGCTTGCCACCATGGAAGAAGCTCCCGTAGCTAGTCAG-3'; SEC ID N.º: 15) con el cebador LSYN-78 (5'-GACTCTCGAGCTATCCATCAGGGCCTAACTCATTAAAG-3'; SEC ID N.º: 16) para amplificar el ADN de 1377 pares de bases. El ADN sintetizado mediante la PCR se digirió con HindIII y XhoI y se ligó a los sitios HindIII y XhoI del pVAX1 para generar pSA-60 (PspA). El ADN recombinante se introdujo en células DH5α de *E. coli* mediante transformación y se verificó por digestión con enzimas de restricción, HindIII and XhoI. Se confirmó el inserto PspA por secuenciación del ADN. La transcripción y la traducción in vitro se realizaron con el kit de TNT (Promega, Madison, WI) según el protocolo del fabricante para confirmar la expresión de pSA-60.

La secuencia de ácido nucleico del inserto PspA pSA-60 es la siguiente:

ATGGAAGAAGCTCCCGTAGCTAGTCAGTCTAAAGCTGAGAAAGACTATGATGCA  
 GCAGTGAAAAAATCTGAAGCTGCTAAGAAGGCTTACGAAGAAGCTAAAAAGAA  
 AGCAGAAGACGCTCAGAAAAAATATGATGAGGATCAGAAGAAAAGCTGAGGCAA  
 AAGCGGATAAGGAAGCAAAGCATCTGCGGAAATAGATAAAGCCACGTTTGCTG  
 TACAAAGTGCGTATGTAAAATTTTTAAATGTCCAATCTAATCGTCAAATTTGCGA  
 GAATGAACGAAAAAACAATTAGCAGAAATAGATAAAGAGATAGAGAATGCTA  
 AACAAAATTTACAGAATAAACAGGAAGAATTTAATAAGGTTAGAGCAGAAGTA  
 ATTCCTGAAGCAAAGGGGTTAGCTGTTACTAAACAAAAAGCGGAAGAAGCTAAA  
 AAAGAAGCAGAAGTAGCTAAGAGAAAATATGATTATGCAACTCTAAAGGTAGC  
 ACTAGCGAAGAAAGAAGTAGAGGCTAAGGAACTTGAAATTGAAAACTTCAAT  
 ATGAAATTTCTACTTTGGAACAAGAAGTTGCTATTGCTCAACATCAAGTAGATAA  
 TTTGAAAAAACTTCTTGCTGGTGCGGATCCTGATGATGGCACAAAAGTTATAGAA  
 GCTAAATTAACAAAGGAGAAGCTGAGCTAAACGCTAAACAAGCTGAGTTAGCA  
 AAAAAACAAACAGAAGCTTGAAAACTTCTTGACAGCCTTGATCCTGAAGGTAAG  
 ACTCAGGATGAATTAGATAAAGAAGCTGCTGAAGCTGAGTTGGATAAAAAAGCT  
 GATGAACTTCAAATAAAGTTGCTGATTTAGAAAAAGGAATTGCTCCTTATCAA  
 ATCAAAGTCGCTGAATTAATAAAGAAATTGCTAGACTTCAAAGCGATTTAAAA  
 GATGCTGAAGAAAATAATGTAGAAGACTATATTAAGAAGGTTTAGAGCAAGCT  
 ATCGCTGATAAAAAAGCTGAATTAGCTACAACCAACAAACATAGATAAAACT  
 CAAAAAGATTTAGAGGATGCTGAATTAGAACTTGAAAAAGTATTAGCTACATTA  
 GACCCTGAAGGTAAACTCAAGATGAATTAGATAAAGAAGCTGCAGAAGATGCT  
 AATATTGAAGCTCTTCAAACAAAGTTGCTGATCTAGAAAACAAGGTTGCTGAA  
 TTAGATAAAGAAGTTACTAGACTTCAAAGCGATTTAAAAGATGCTGAAGAAAAC  
  
 AATGTAGAAGACTACGTTAAAGAAGGCTTAGATAAAGCTCTTACTGATAAAAAA  
 GTTGAATTAATAATACTCAAAAAGCATTAGATACTGCTCAAAAAGCATTAGAT  
 ACTGCTCTTAATGAGTTAGGCCCTGATGGA (SEQ ID NO:17).

La secuencia de ácido nucleico codificada por el inserto PspA pSA-60 es la siguiente:

MEEAPVASQSKAEKDYDAAVKKSEAAKKAYEEAKKKAEDAQKKYDEDQKKTEAL  
 ADKEAKASAEIDKATFAVQSAYVKFLNVQSNRQISENERKKQLAEIDKEIENAKQNI  
 QNKQEEFNKVRAEVIPEAKGLAVTKQKAEAEAKKEAEVAKRKYDYATLKVALAKK  
 VEAKELEIEKLQYEISTLEQEVIAIAQHVDNLKKLLAGADPDDGTVIEAKLNKGEA  
 ELNAKQAELAKKQTELEKLLDSLDPGKTQDELDEKAAEAELDKKADELQNKVAE  
 LEKGIAPYQIKVAELNKEIARLQSDLKDAEENNVEDYIKEGLEQAIADKKAELATTQ  
 QNIDKTQKDLEDAELELEKVLATLDPEGKTQDELDEKAAEDANIEALQNKVADLEN  
 KVAELDKVTRLQSDLKDAEENNVEDYVKEGLDKALTDKKVELNNTQKALDTAQ  
 ALDTALNELGPDG (SEQ ID NO:18).

#### **Ejemplo 7: capacidad inmunógena de las vacunas de ADN**

5 El vector plasmídico PSA-7 codifica una proteína neumolisina de longitud total. El gen Ply del tipo 19A se amplificó por PCR utilizando perlas de PCR Ready-to-go que contenían cebadores y la plantilla de ADN cromosómico 19A neumocócico. La PCR se realizó a 94 °C, 4 minutos para 1 ciclo, 94 °C, 1 minuto, 55 °C, 1 minuto y 72 °C, 1,5 minutos para 30 ciclos, y 72 °C, 10 minutos para 1 ciclo. El cebador LSYN-15 (5'-GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 4) complementario a nucleótidos Ply 1 a 24 del extremo 5' se utilizó con el cebador LSYN-3 (5'-CAGTGGATCCTTACTAGTCATTTTCTACCTTATC-3'; SEC ID N.º: 3) complementario a los nucleótidos Ply 1396 a 1413 del extremo 3' para amplificar el ADN de 1413 pares de bases que codifica la proteína Ply natural de longitud total de 471 aminoácidos. El fragmento de ADN sintetizado mediante la PCR se trató con NheI y BamHI y se ligó a los sitios NheI y BamHI del vector de expresión pVAX1 para generar pSA-7. El ADN recombinante se introdujo en células DH5α de *E. coli* mediante transformación y se verificó por digestión con enzimas de restricción, NheI and BamHI. El gen Ply natural del tipo 19A introducido se confirmó mediante secuenciación del ADN.

15 El vector plasmídico pSA-10 codifica una proteína neumolisina truncada carboxiterminal (que carece de 114 aminoácidos en el extremo carboxiterminal de Ply). El gen Ply del tipo 19A se amplificó por PCR utilizando perlas de PCR Ready-to-go que contenían cebadores y la plantilla de ADN cromosómico 19A neumocócico. La PCR se realizó a 94 °C, 4 minutos para 1 ciclo, 94 °C, 1 minuto, 55 °C, 1 minuto y 72 °C, 1,5 minutos para 30 ciclos, y 72 °C, 10 minutos para 1 ciclo. El cebador LSYN-15 (5'-GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 4) complementario a nucleótidos Ply 1 a 24 del extremo 5' se utilizó con el cebador LSYN-6 (5'-CTGAGGATCCTTACTAAGCTGTAACCTTAGTCTC-3'; SEC ID N.º: 19) complementario a los nucleótidos Ply 1054 a 1071 del extremo 3' para amplificar un ADN de 1071 pares de bases que codifica un polipéptido de 357 aminoácidos. El fragmento de ADN sintetizado mediante la PCR se trató con NheI y BamHI y se ligó a los sitios NheI y BamHI del vector de expresión pVAX1 para generar pSA-10. El ADN recombinante se introdujo en células DH5α de *E. coli* mediante transformación y se verificó por digestión con enzimas de restricción, NheI and BamHI. El gen de la pseudoneumolisina del tipo 19A introducido se confirmó mediante secuenciación del ADN.

20 El vector plasmídico PSA-26 codifica una proteína neumolisina de longitud total que presenta un motivo CpG. Los cebadores de la PCR LSYN-34 y LSYN-33, que contienen dos oligonucleótidos complementarios que presentan el motivo CpG en los extremos 3', se utilizaron para cebar la PCR1 y la PCR2. Los segundos cebadores LSYN-15 y LSYN-3 son complementarios a las secuencias de las regiones aminoterminal y carboxiterminal de la neumolisina, respectivamente. En una amplificación separada, los primeros productos de la PCR, PCR1 (1,2 kb) y PCR2 (150 pb) se generan por PCR utilizando perlas de PCR Ready-to-go, con los cebadores LSYN-15 y -34 (PCR1) y LSYN-33 y -3 (PCR2) y la plantilla pSA7 que contiene el gen de la neumolisina de longitud total. Los primeros productos de la PCR se mezclaron y se desnaturalizaron, y se utilizaron como plantillas para generar el segundo producto de la PCR, que se cebó con el segundo conjunto de cebadores LSYN-15 y -3. El segundo producto de la PCR se cortó con NheI y BamHI, y se clonó en NheI y BamHI del pVAX1 para generar pSA-26. La PCR se realizó a 94 °C, 4 minutos para 1 ciclo, 94 °C, 1 minuto, 55 °C, 1 minuto y 72 °C, 1 minuto para 30 ciclos, y 72 °C, 8 minutos para 1 ciclo.

30 El vector plasmídico PSA-26 codifica una proteína neumolisina de longitud total que presenta un motivo CpG. Los cebadores de la PCR LSYN-34 y LSYN-33, que contienen dos oligonucleótidos complementarios que presentan el motivo CpG en los extremos 3', se utilizaron para cebar la PCR1 y la PCR2. Los segundos cebadores LSYN-15 y LSYN-3 son complementarios a las secuencias de las regiones aminoterminal y carboxiterminal de la neumolisina, respectivamente. En una amplificación separada, los primeros productos de la PCR, PCR1 (1,2 kb) y PCR2 (150 pb) se generan por PCR utilizando perlas de PCR Ready-to-go, con los cebadores LSYN-15 y -34 (PCR1) y LSYN-33 y -3 (PCR2) y la plantilla pSA7 que contiene el gen de la neumolisina de longitud total. Los primeros productos de la PCR se mezclaron y se desnaturalizaron, y se utilizaron como plantillas para generar el segundo producto de la PCR, que se cebó con el segundo conjunto de cebadores LSYN-15 y -3. El segundo producto de la PCR se cortó con NheI y BamHI, y se clonó en NheI y BamHI del pVAX1 para generar pSA-26. La PCR se realizó a 94 °C, 4 minutos para 1 ciclo, 94 °C, 1 minuto, 55 °C, 1 minuto y 72 °C, 1 minuto para 30 ciclos, y 72 °C, 8 minutos para 1 ciclo.

35 La secuencia de los cebadores LSYN-3, LSYN-15, LSYN-33 y LSYN-34 son las siguientes: cebador LSYN-3 (5'-CAGTGGATCCTTACTAGTCATTTTCTACCTTATC-3'; SEC ID N.º: 3); cebador LSYN-15 (5'-GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 4); cebador LSYN-33 (5'-CAAAATTAGAGAACGTTCCGGGCTTGCCTGGGAATGG-3'; SEC ID N.º: 20), cebador LSYN-34 (5'-GCCCCGAACGTTCTCTAATTTTGACAGAGAGATTACG-3'; SEC ID N.º: 21).

El ADN recombinante se introdujo en células DH5 $\alpha$  de *E. coli* mediante transformación y se verificó por digestión con enzimas de restricción, NheI and BamHI. El gen Ply natural del tipo 19A introducido que presentaba un motivo CpG se confirmó mediante secuenciación del ADN.

El vector plasmídico pSA-27 contiene un motivo CpG y codifica un truncamiento carboxiterminal de la neumolisina (11 aminoácidos eliminados). Los cebadores LSYN-34 y LSYN-33, que contienen dos oligonucleótidos complementarios que presentan el motivo CpG en los extremos 3', se utilizaron para cebar la PCR1 y la PCR2. Los segundos cebadores LSYN-15 y LSYN-3 son complementarios a las secuencias de las regiones aminoterminal y carboxiterminal de la neumolisina, respectivamente. En una amplificación separada, los primeros productos de la PCR, PCR1 (1,2 kb) y PCR2 (150 pb) se generan por PCR utilizando perlas de PCR Ready-to-go, con los cebadores LSYN-15 y -34 (PCR1) y LSYN-33 y -3 (PCR2) y la plantilla pSA-7 que contiene el gen de la neumolisina de longitud total.

Los primeros productos de la PCR se mezclaron y se desnaturalizaron, y se utilizaron como plantillas para generar el segundo producto de la PCR, que se cebó con el segundo conjunto de cebadores LSYN-15 y -4. El segundo producto de la PCR se cortó con NheI y BamHI, y se clonó en NheI y BamHI del pVAX1 para generar pSA-27. La PCR se realizó a 94 °C, 4 minutos para 1 ciclo, 94 °C, 1 minuto, 55 °C, 1 minuto y 72 °C, 1 minuto para 30 ciclos, y 72 °C, 8 minutos para 1 ciclo. Los oligonucleótidos de los cebadores LSYN-3, LSYN-4, LSYN-15 y LSYN-33 son los siguientes: cebador LSYN-3 (5'-CAGTGGATCCTTACTAGTACATTTTCTACCTTATC-3'; SEC ID N.º: 3); cebador LSYN-4 (5'-GACTGGATCCTTACTAGAGAGTTGTTCCCAAATAG-3'; SEC ID N.º: 5); cebador LSYN-15 (5'-GACTGCTAGCCACCATGGCAAATAAAGCAGTAAATGAC-3'; SEC ID N.º: 4); cebador LSYN-33 primer (5'-CAAATTAGAGAACGTTCCGGGCTTGCCTGGGAATGG-3'; SEC ID N.º: 20); cebador LSYN-34 (5'-GCCCGGAACGTTCTCTAATTTGACAGAGAGATTACG-3'; SEC ID N.º: 21). El ADN recombinante se introdujo en células DH5 $\alpha$  de *E. coli* mediante transformación y se verificó por digestión con enzimas de restricción, NheI y BamHI. El gen de la pseudoneumolisina del tipo 19A introducido que presentaba el motivo CpG se confirmó mediante secuenciación del ADN.

Un programa de vacunación que implica el cebado con un vector de ADN y el recuerdo con una proteína ha dado como resultado la generación de una inmunidad específica de alto nivel y, en algunos casos, ofrece protección contra agentes infecciosos que actualmente plantean grandes problemas para el desarrollo de vacunas. En estos experimentos, se cebaron conejos tres veces con un vector de ADN de neumolisina y se realizó el recuerdo con una proteína neumolisina sin aditivo.

La figura 16 es un gráfico que representa una respuesta de los anticuerpos antineumolisina en conejos utilizando una estrategia de sensibilización - recuerdo para la vacunación con ADN de pseudoneumolisina, tal como se ha descrito anteriormente. Los carriles 1, 2, y 3 representan las respuestas inmunitarias 7 días después de una primera (1), segunda (2) y tercera (3) vacunación intramuscular con ADN de pseudoneumolisina. El carril 4 representa la respuesta 10 días después de la dosis de recuerdo con proteínas (200  $\mu$ g de neumolisina). El carril 5 representa la respuesta de los anticuerpos 10 días después de la inyección de 200  $\mu$ g de la proteína neumolisina junto con el aditivo TiterMax. Los resultados demuestran que tres inyecciones de ADN más una dosis de recuerdo con la proteína pueden obtener una mayor respuesta de los anticuerpos en comparación con un método de vacunación tradicional con proteínas utilizando un aditivo.

Las vacunas de ADN pSA-59 y pSA-60, y un vector de ADN plasmídico de control, en una cantidad de 100  $\mu$ g cada uno en un volumen total de 0,1 ml en 1 x PBS, se inyectaron por vía intramuscular en ambos músculos cuádriceps o en las extremidades posteriores de ratones Balb/C. Se inyectaron a los ratones 4 dosis de 100  $\mu$ g de vacunas de ADN con intervalos de 2 semanas entre las inyecciones. Siete días después de la inyección final, se determinaron los niveles en suero de anticuerpos IgG mediante la prueba ELISA. Los ratones que recibieron 4 inyecciones de vacunas de ADN produjeron 9600 veces más IgG Ab que el grupo de control. Estos resultados indican que el ADN plasmídico puede expresar los antígenos de la autolisina o de la proteína de superficie A neumocócica in vivo y estimular el sistema inmunitario para producir unos niveles elevados de anticuerpos de IgG específicos en los ratones.

La figura 17 es un gráfico de la respuesta de los anticuerpos a la proteína de superficie A neumocócica 7 días después de la cuarta inyección con la vacuna con ADN de la PspA. La figura 18 es un gráfico de la respuesta de los anticuerpos a la autolisina 7 días después de la cuarta inyección con la vacuna con ADN de la autolisina.

#### **Ejemplo 8: inmunidad protectora y protección cruzada contra la exposición a serotipos heterólogos de neumococos virulentos**

Se inyectaron a los ratones por vía intraperitoneal tres dosis de 2,5  $\mu$ g del conjugado de polisacárido y pseudoneumolisina del serotipo 14 (-7 aminoácidos) a intervalos de 2 semanas. En los grupos de control, el conjugado se sustituyó con PBS. Ocho días después de la tercera inyección, los ratones inmunizados se expusieron por vía intraperitoneal a entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  UFC (unidades formadoras de colonias) de neumococos / 0,1 ml. El número exacto de UFC por mililitro inyectado se determinó por recuento en placa utilizando placas de agar con

sangre de oveja. Al cabo de 1, 3, y 5 horas después de la exposición, se sembraron 5  $\mu$ l y 20  $\mu$ l de muestras de sangre de cada ratón en placas de agar con sangre de oveja y se incubaron a 37 °C durante la noche. Se encontraron diferencias significativas en la eliminación de bacterias en las muestras de sangre de los ratones vacunados con el conjugado con respecto a los controles tras la exposición.

La figura 19 representa la eliminación de bacterias de la sangre de ratones inmunizados con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14 cuando se exponen a neumococos del tipo 14. Se produjeron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) en las UFC entre los grupos tratados con el conjugado y con PBS 1, 3, y 5 horas después de la exposición.

La figura 20 representa la eliminación de bacterias de la sangre de ratones inmunizados con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14 cuando se exponen a neumococos del tipo 7. Se produjeron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) en las UFC entre los grupos tratados con el conjugado y con PBS 1, 3, y 5 horas después de la exposición. Estos datos también indican que se proporcionó a los ratones inmunizados con el conjugado protección cruzada contra la exposición a un serotipo heterólogo neumocócico.

La figura 21 representa la eliminación de bacterias de la sangre de ratones inmunizados con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14 cuando se exponen a neumococos del tipo 6B. Se produjeron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en las UFC entre los grupos tratados con el conjugado y con PBS 1, 3, y 5 horas después de la exposición. Estos datos también indican que se proporcionó a los ratones inmunizados con el conjugado protección cruzada contra la exposición a un serotipo heterólogo neumocócico.

La figura 22 representa la eliminación de bacterias de la sangre de ratones inmunizados con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14 cuando se exponen a neumococos del tipo 18C. Se produjeron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) en las UFC entre los grupos tratados con el conjugado y con PBS 1, 3, y 5 horas después de la exposición. Estos datos también indican que se proporcionó a los ratones inmunizados con el conjugado protección cruzada contra la exposición a un serotipo heterólogo neumocócico.

Las figuras 23 a 25 representan la eliminación de bacterias de la sangre de ratones inmunizados con un conjugado de polisacárido y seudoneumolisina del serotipo 14 cuando se exponen a neumococos del tipo 23F. Se produjeron diferencias significativas ( $P < 0,01$ ) en las UFC entre los grupos tratados con el conjugado y con PBS 1 (figura 23), 3 (figura 24), y 5 (figura 25) horas después de la exposición. Estos datos también indican que se proporcionó a los ratones inmunizados con el conjugado protección cruzada contra la exposición a un serotipo heterólogo neumocócico.

### **Ejemplo 9: Prueba opsonocitofágica**

#### **A. Prueba opsonocitofágica**

La actividad funcional de un anticuerpo contra polisacárido neumocócico del serotipo 14 se determinó mediante una prueba opsonocitofágica utilizando leucocitos polimorfonucleares humanos (PMNL). Los antisueros se diluyeron en serie (dos veces) y se combinaron 20  $\mu$ l de cada muestra de suero con 20  $\mu$ l de suspensión bacteriana, que contenía aproximadamente 200 UFC en un medio de infusión de cerebro y corazón y se incubó a 37 °C durante 15 minutos. Tras la incubación, se añadieron 10  $\mu$ l de complemento de crías de conejo y 40  $\mu$ l de PMNL ( $4 \times 10^5$  células). La mezcla se incubó a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 60 minutos. Para obtener unos recuentos celulares viables, se inoculó una cantidad de 20  $\mu$ l de cada muestra en placas de agar con sangre por triplicado y se mantuvieron a 37 °C durante la noche. El control del complemento comprendía todos los reactivos del ensayo excepto los anticuerpos contra los neumococos. Los valores opsonocitofágicos se presentaron como los recíprocos de la dilución más alta de suero con > 50% de eliminación de bacterias en comparación con el crecimiento en el complemento.

#### **B. Fagocitos**

Se aislaron PMNL recientes a partir de sangre periférica de un voluntario adulto sano por sedimentación en dextrano y separación de células mononucleares y PMNL en Ficoll (ICN Biomedical Company, medio de separación de linfocitos # 16-922-54). Se procedió a la lisis de los eritrocitos con una disolución amortiguadora de lisis ACK (Biofluids, número de producto P304-100). La concentración final de células se ajustó a  $1 \times 10^7$  células/ml en BME (Life Technologies Gibco BRL, medio de cultivo Eagle). Se utilizaron 40  $\mu$ l de  $2$  a  $4 \times 10^5$  células de PMNL para cada muestra.

#### **C. Suero de ratón y bacterias**

Los antisueros de ratón contra el polisacárido 14 se diluyeron en serie en medio de infusión de cerebro y corazón (dos veces, de 1:2 a 1:256) y se mezclaron 20  $\mu$ l de cada muestra de suero con 20  $\mu$ l de suspensión bacteriana (200 UFC de *S. pneumoniae* del serotipo 14) a 37 °C durante 15 minutos.

Se cultivó el *S. pneumoniae* del serotipo 14 en medio de infusión de cerebro y corazón a 37 °C durante 10 horas. Se realizaron diluciones en serie 10 veces para determinar el número de bacterias utilizadas en este experimento. Se aplicaron 100 µl de muestra a una placa. Se encontraron 10 UFC en la placa utilizando la muestra con una dilución de 1:10<sup>7</sup> y se encontraron 91 UFC en la placa utilizando la muestra con una dilución de 1:10<sup>6</sup>. De este modo, se determinó que la concentración de bacterias utilizada en el experimento era aproximadamente de 1 x 10<sup>9</sup> UFC/ml. Se diluyeron 1 x 10<sup>9</sup> UFC/ml del *S. pneumoniae* del serotipo 14 hasta 1 x 10<sup>4</sup> UFC/ml. Se utilizaron 200 UFC/20 µl para cada muestra.

D. Complemento y PMNL

Tras la incubación, se añadieron 10 µl de complemento de crías de conejo (unas cantidades de suero de conejo joven recién recogidas y almacenadas a -80 °C antes de utilizarlas) y 40 µl de células PMNL 2,8 x 10<sup>5</sup>. La mezcla se incubó a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 60 minutos.

E. Recuentos de UFC

Para obtener unos recuentos celulares viables, se inoculó una cantidad de 20 µl de dos diluciones, 1:10 y 1:100 de cada muestra en placas de agar con sangre por triplicado y se mantuvieron a 37 °C durante la noche. El control del complemento comprendía todos los reactivos del ensayo excepto los anticuerpos contra los neumococos.

F Actividad opsonocitofágica

Los valores opsonocitofágicos se presentan los recíprocos de la dilución más alta de suero con > 50% de eliminación de bacterias en comparación con el crecimiento en el control del complemento.

Tabla 5: Actividad de opsonización de los anticuerpos de ratón contra polisacárido del serotipo 14

Dilución de las muestras

Ratón n.º	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	Control
Vacuna									
1, UFC		12	20	22	25	28	32	45	81
% de eliminación		85%	76%	73%	69%	65%	60%	44%	
2, UFC		17	18	17	17	32	50	51	81
% de eliminación		79%	78%	79%	79%	60%	38%	37%	
3, UFC		19	27	31	31	32	44	56	81
% de eliminación		77%	67%	62%	62%	60%	46%	31%	
4, UFC		15	22	23	19	33	36	40	81
% de eliminación		81%	73%	72%	77%	59%	56%	51%	
5, UFC		22	26	34	27	33	43	51	81
% de eliminación		73%	68%	58%	67%	59%	47%	37%	
6, UFC		22	17	19	28	43	51	57	81
% de eliminación		73%	79%	77%	65%	47%	37%	30%	
7, UFC		22	29	29	26	28	29	57	81
% de eliminación		73%	64%	64%	68%	65%	64%	30%	
8, UFC		31	23	31	35	48	63	63	81
% de eliminación		62%	72%	62%	57%	41%	22%	22%	

Valor del suero de ratón con respecto a la actividad de opsonización  
 #1, 128 #2, 64 #3, 64 #4, 256 #5, 128 #6, 32 #7, 128 #8, 32.

5

Tabla 6: Respuestas de los anticuerpos (Ac) contra el polisacárido del serotipo 14 (PS) y la seudoneumolisina (PPN)

Ratón n.º	Ac contra PS		Ac contra PPN	
	Valor	DO <sub>405</sub> (1:300)	Valor	DO <sub>405</sub> (1:300)
1	76800	0,735	9600	0,454
2	76800	0,520	9600	0,360
3	76800	0,738	9600	0,285
4	19200	0,677	9600	0,266
5	19200	0,684	9600	0,381
6	4800	0,518	4800	0,261
7	76800	0,815	9600	0,348
8	4800	0,585	1200	0,125

10

Tal como se representa en las Tablas 5 y 6, los ratones (por ejemplo, los ratones número 1, 2, 3, 4, 5, y 7) con unas respuestas de anticuerpos superiores contra el polisacárido del serotipo 14 y la seudoneumolisina presentaron una mayor actividad de opsonización, mientras que los ratones (por ejemplo, los ratones número 6 y 8) con unos valores de anticuerpos inferiores contra el polisacárido del serotipo 14 y la seudoneumolisina presentaron una actividad de opsonización inferior. No se detectó actividad de opsonización en los ratones inyectados con PBS.

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

5 *La presente lista de referencias citadas por el solicitante se presenta únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque la recopilación de las referencias se ha realizado muy cuidadosamente, no se pueden descartar errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina toda responsabilidad en este sentido.*

**Documentos de patente citados en la descripción**

- EP 687688 A [0002]
- US 4242501 A [0040]
- US 4686102 A [0040]
- US 5623057 A [0040]
- US 5565204 A [0040]

10

**Documentos que no corresponden a patentes citados en la descripción**

- OWEN et al. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, vol. 121, 217-222 [0038]
- DONNELLY et al. *J. Immunol. Methods*, 1994, vol. 176, 145 [0054]
- VITIELLO et al. *J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 95, 341 [0054]
- *Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines for Preventive Infectious Disease Indications*, 22 December 1996 [0101]

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende un polipéptido conjugado con un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae*, en la que el polipéptido comprende un fragmento de por lo menos 400 aminoácidos contiguos de una proteína neumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, careciendo el polipéptido de la secuencia de aminoácidos KVEND (SEC ID N.º: 22), careciendo el polipéptido de actividad hemolítica, consistiendo el polipéptido en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los aminoácidos 1 a 465 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 464 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 469 de SEC ID N.º: 1, y los aminoácidos 1 a 470 de SEC ID N.º: 1 y provocando la composición una respuesta inmunitaria contra el *Streptococcus pneumoniae* cuando se administra a un mamífero.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que el polipéptido carece de la secuencia de aminoácidos EDKVEND (SEC ID N.º: 23).
- 15 3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el polisacárido capsular se selecciona de entre los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.
- 20 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que la composición comprende una pluralidad de polisacáridos capsulares seleccionados de entre los serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F.
5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria humoral o una respuesta inmunitaria celular.
- 25 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la respuesta inmunitaria se dirige contra un polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* y/o una proteína neumolisina de *Streptococcus pneumoniae*.
7. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la preparación de un medicamento efectivo para provocar una respuesta inmunitaria contra *Streptococcus pneumoniae* en un mamífero.
- 30 8. Utilización según la reivindicación 7, en la que la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria preventiva o una respuesta inmunitaria terapéutica.
9. Utilización según la reivindicación 7, en la que la respuesta inmunitaria es una reacción cruzada contra por lo menos un serotipo de *Streptococcus pneumoniae* que difiere del serotipo del polisacárido capsular presente en la composición.
- 35 10. Utilización según la reivindicación 9, en la que el polisacárido capsular se selecciona de entre el serotipo 7, el serotipo 6B, el serotipo 18C y el serotipo 23F.
- 40 11. Utilización según la reivindicación 7, en la que la respuesta inmunitaria es una reacción cruzada contra por lo menos un elemento del género *Streptococcus* que no es *Streptococcus pneumoniae*.
- 45 12. Utilización de un vector de expresión de mamífero que comprende un promotor unido de un modo funcional a una secuencia de nucleótidos que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* o un fragmento antigénico del mismo; y un polipéptido de neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* purificado o fragmento antigénico del mismo, para la preparación de medicamentos efectivos en la administración combinada para provocar una respuesta inmunitaria contra la neumolisina de *Streptococcus pneumoniae* en un mamífero.
- 50 13. Utilización según la reivindicación 12, en la que se administran al mamífero por lo menos dos dosis separadas del vector de expresión.
- 55 14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, en la que la administración del polipéptido de neumolisina o fragmento antigénico del mismo se realiza por lo menos una semana tras la administración del vector de expresión.
- 60 15. Composición que comprende un polipéptido conjugado con un polisacárido bacteriano que no procede de *Streptococcus pneumoniae*, en la que el polipéptido comprende un fragmento de por lo menos 400 aminoácidos contiguos de una proteína neumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, careciendo el polipéptido de la secuencia de aminoácidos KVEND (SEC ID N.º: 22), careciendo el polipéptido de actividad hemolítica, consistiendo el polipéptido en una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre los aminoácidos 1 a 465 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 464 de SEC ID N.º: 1, los aminoácidos 1 a 469 de SEC ID N.º: 1, y los aminoácidos 1 a 470 de SEC ID N.º: 1 y provocando la composición una respuesta inmunitaria contra la bacteria que no es *Streptococcus pneumoniae* cuando se administra a un mamífero.
- 65

16. Composición según la reivindicación 15, en la que la bacteria que no es *Streptococcus pneumoniae* se selecciona de entre el neumococo, *Haemophilus influenza* del tipo B; los grupos meningocócicos A, B o C; y el grupo B, el estreptococo del tipo Ia, Ib, II, III, V o VIII.
- 5 17. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 16 o 16 para la preparación de un medicamento efectivo para provocar una respuesta inmunitaria contra una bacteria que no es *Streptococcus pneumoniae* en un mamífero.

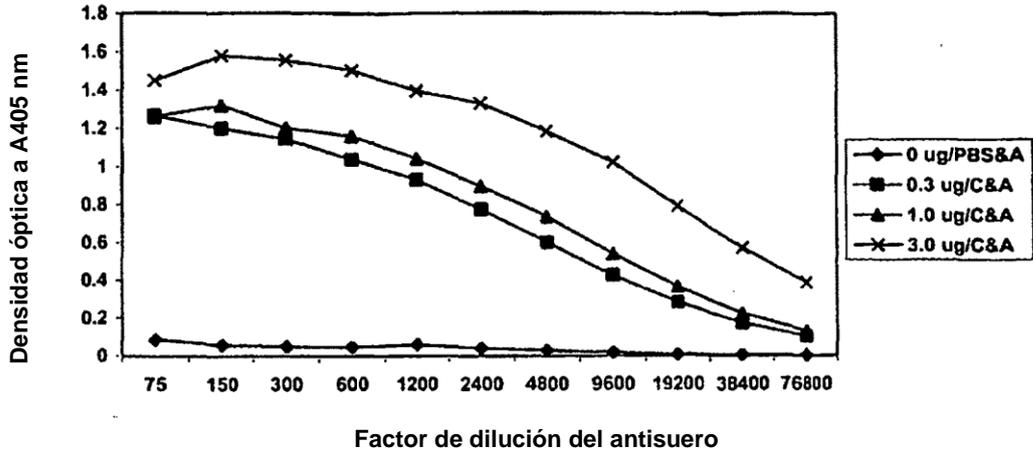


Fig. 1

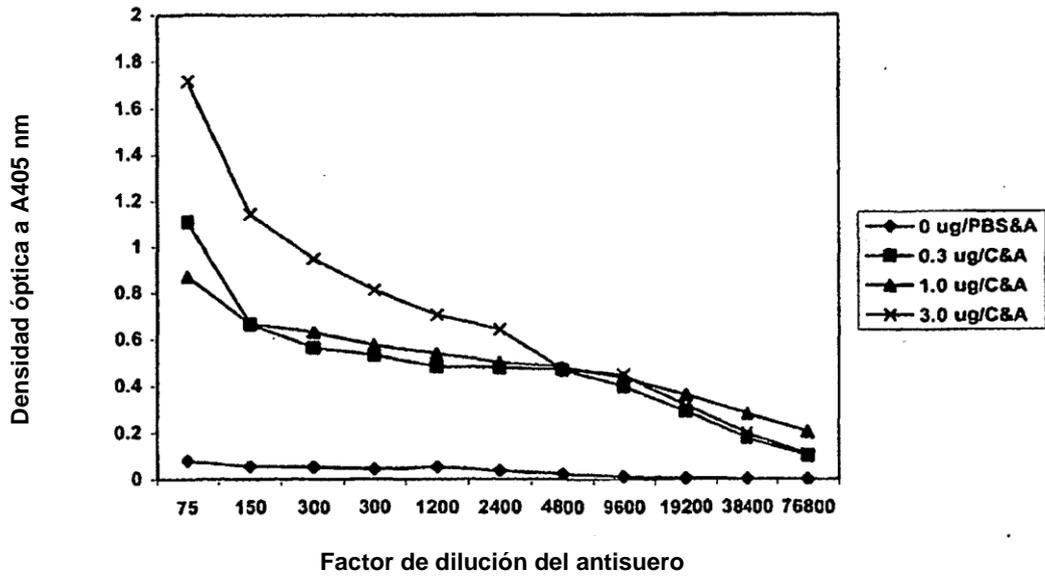


Fig. 2

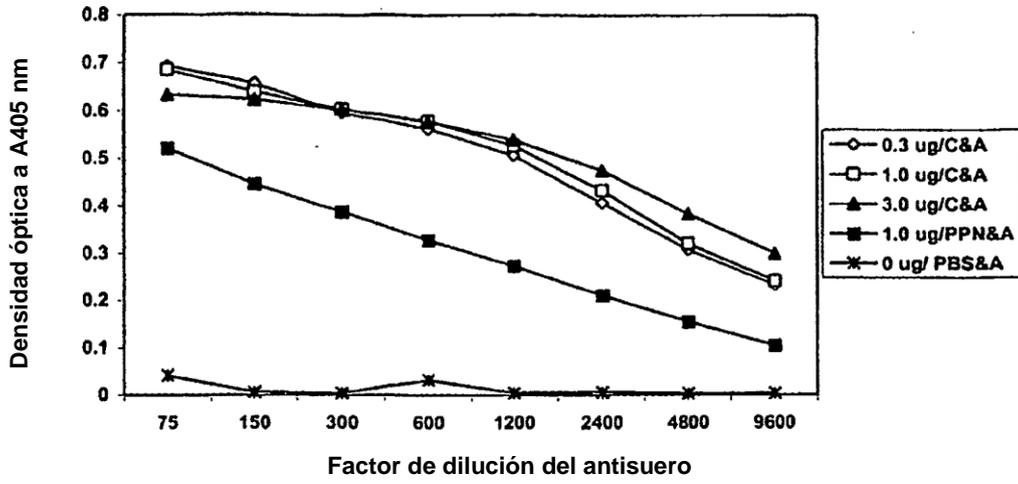


Fig. 3

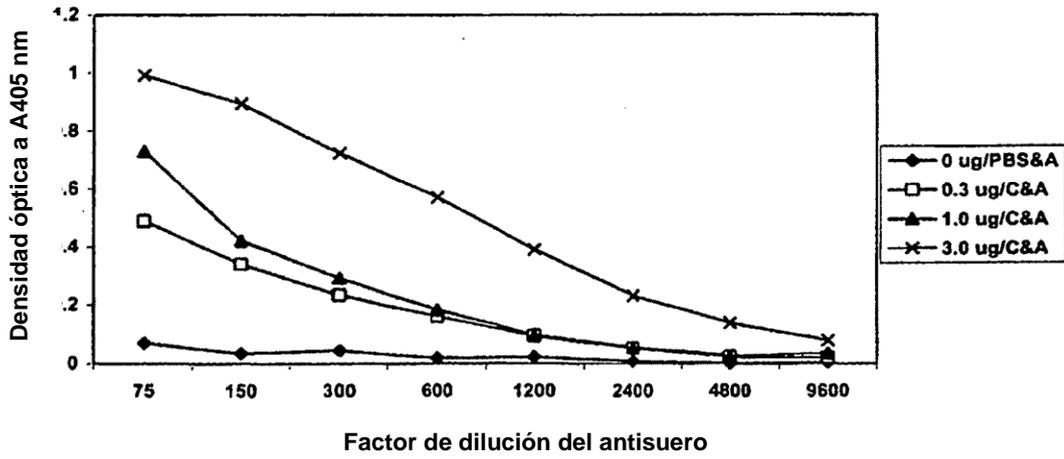


Fig. 4

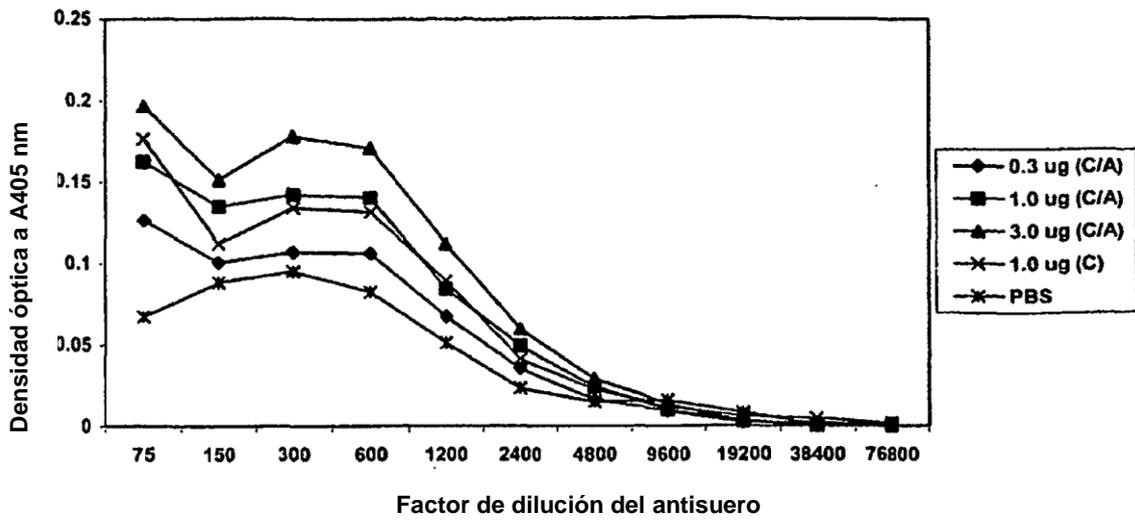


Fig. 5

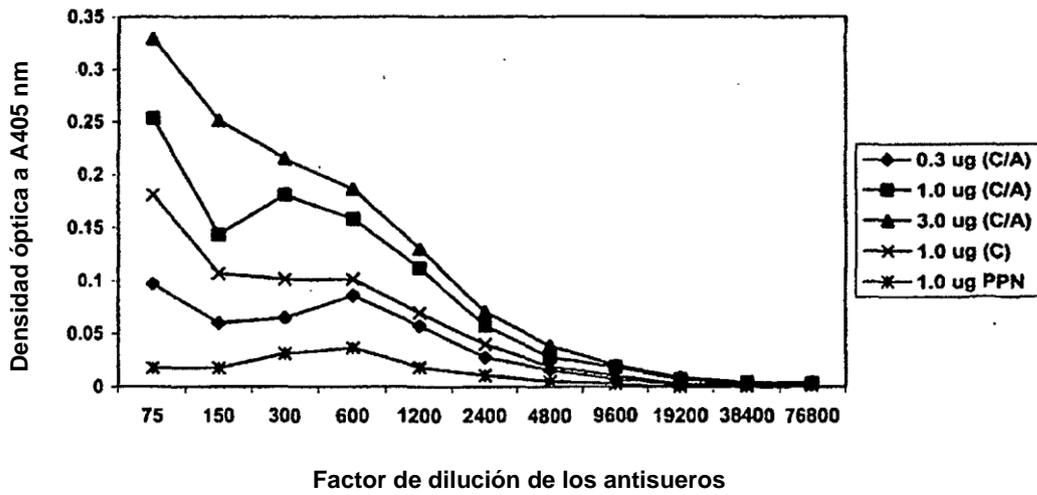


Fig. 6

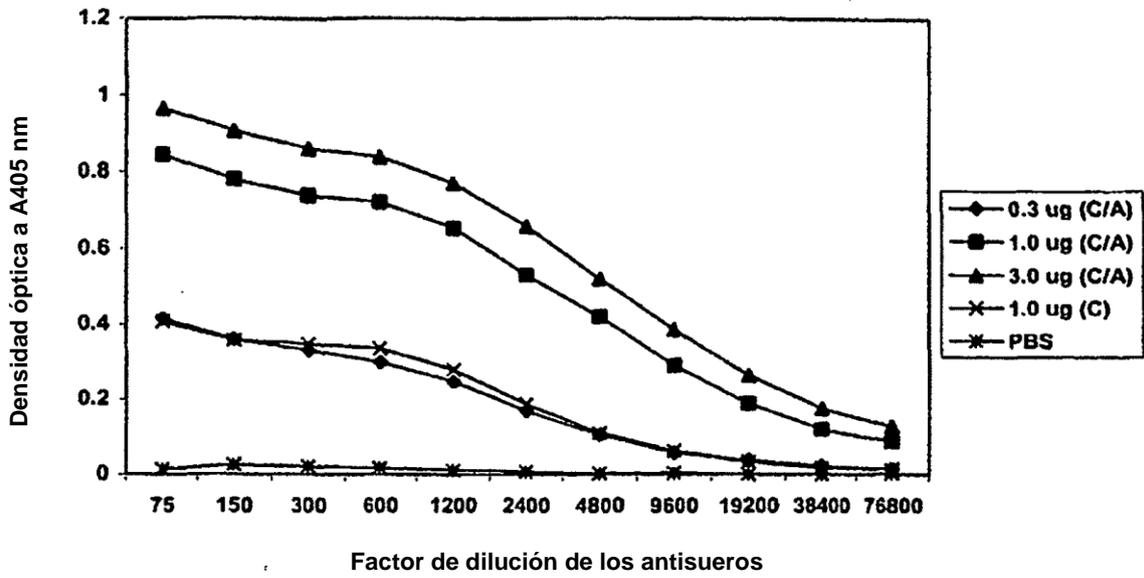


Fig. 7

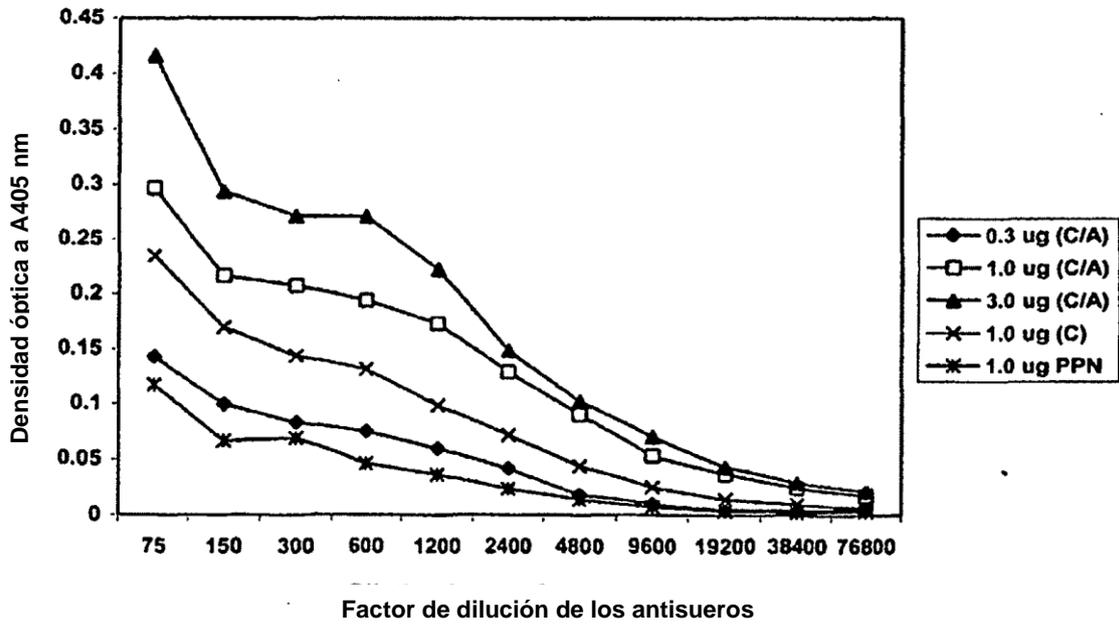


Fig. 8

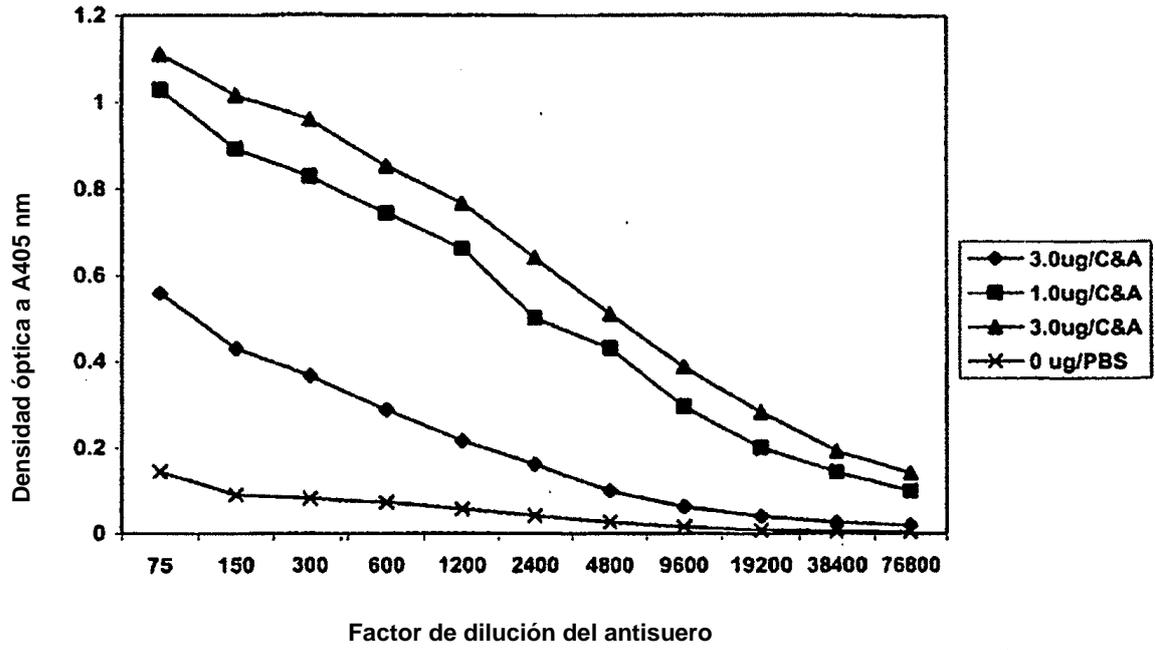


Fig. 9

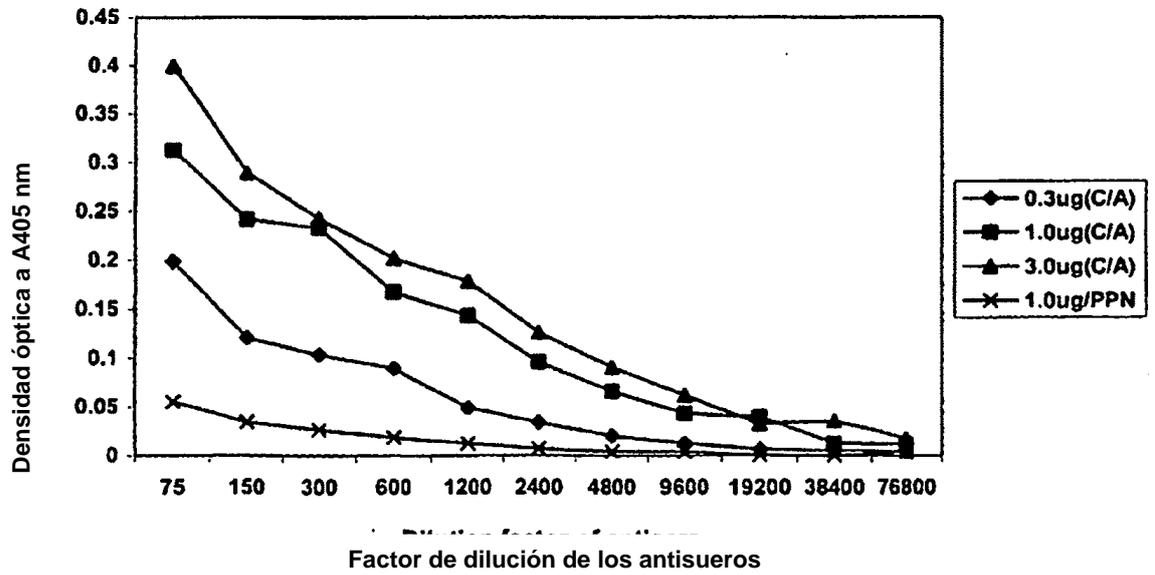


Fig. 10

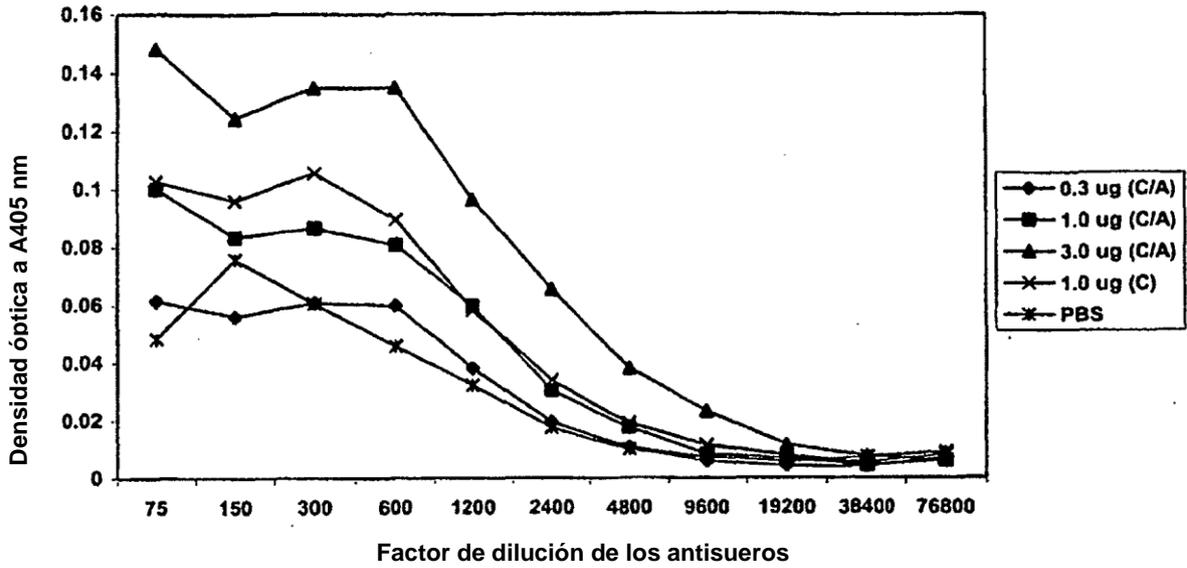


Fig. 11

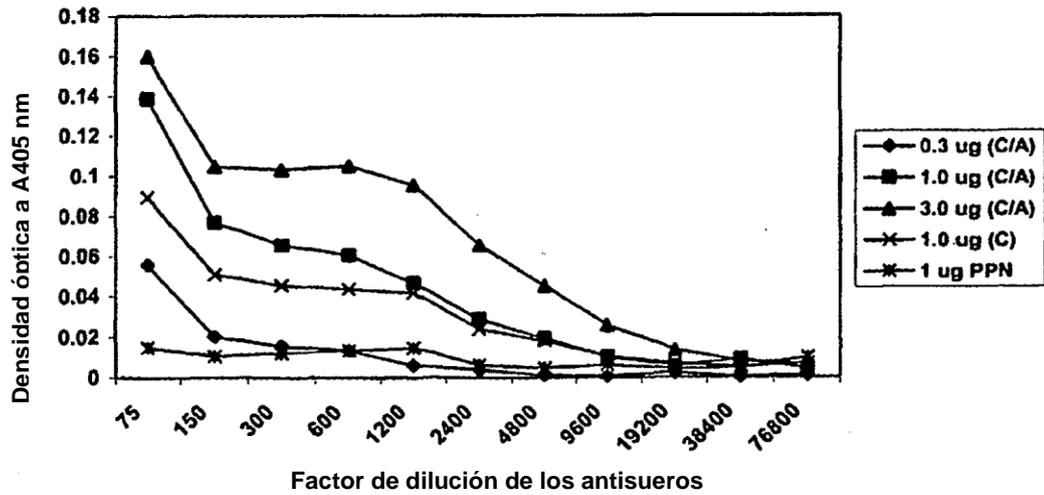


Fig. 12

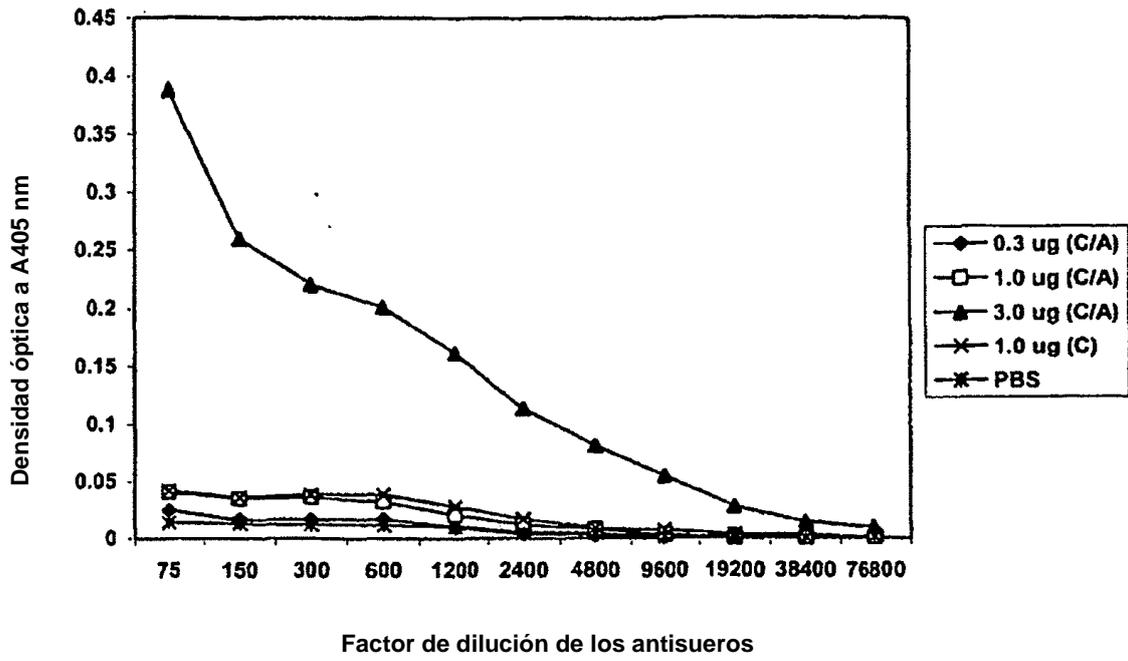


Fig. 13

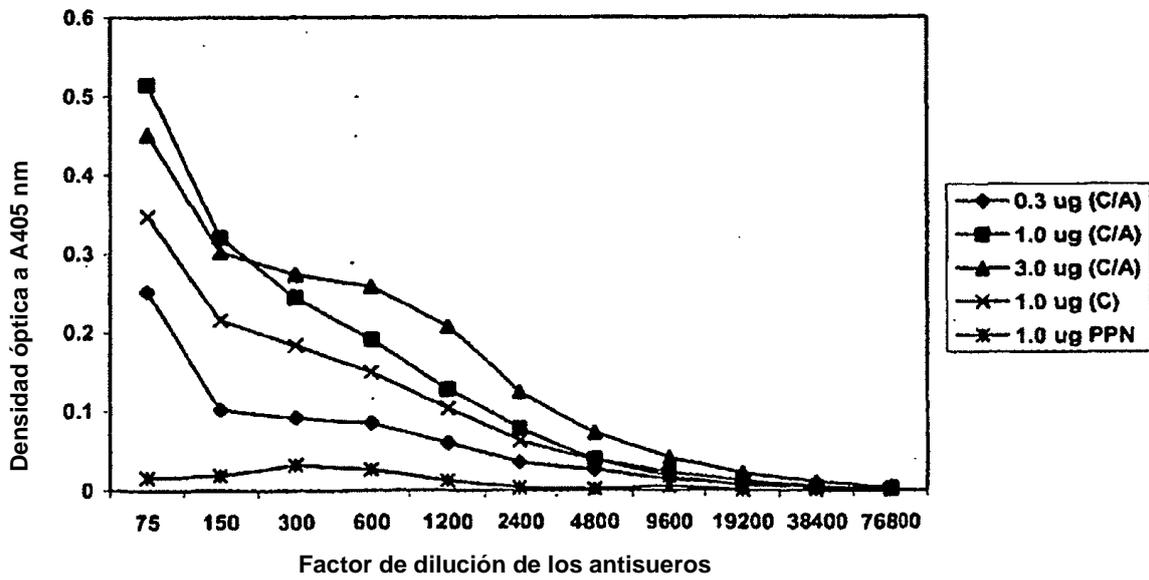
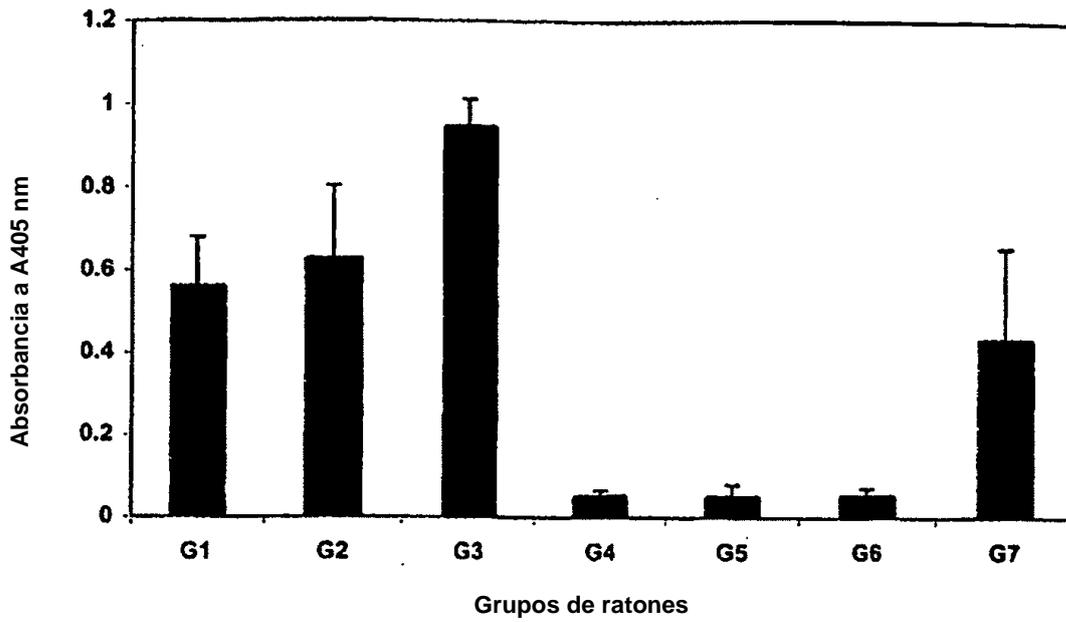
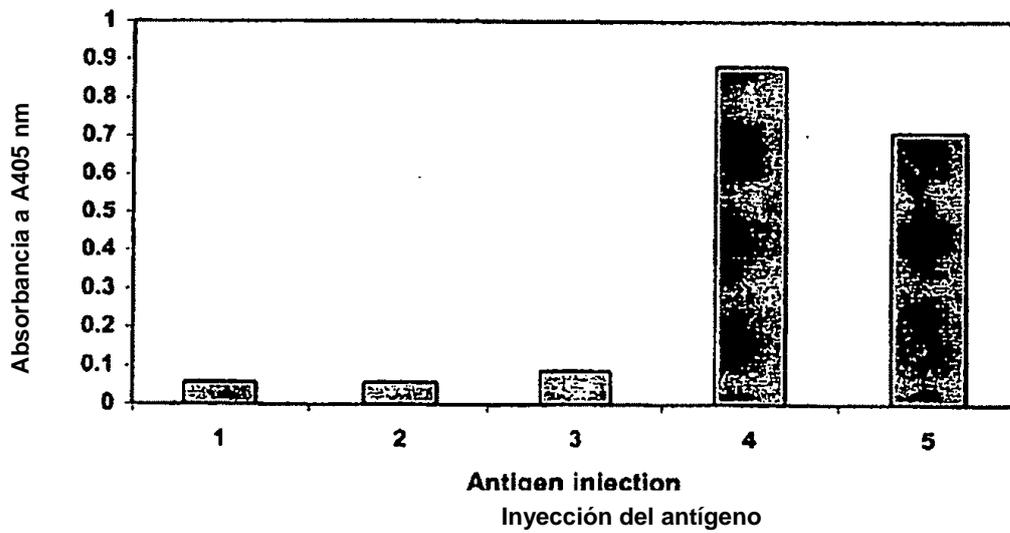


Fig. 14



**Fig. 15**



**Fig. 16**

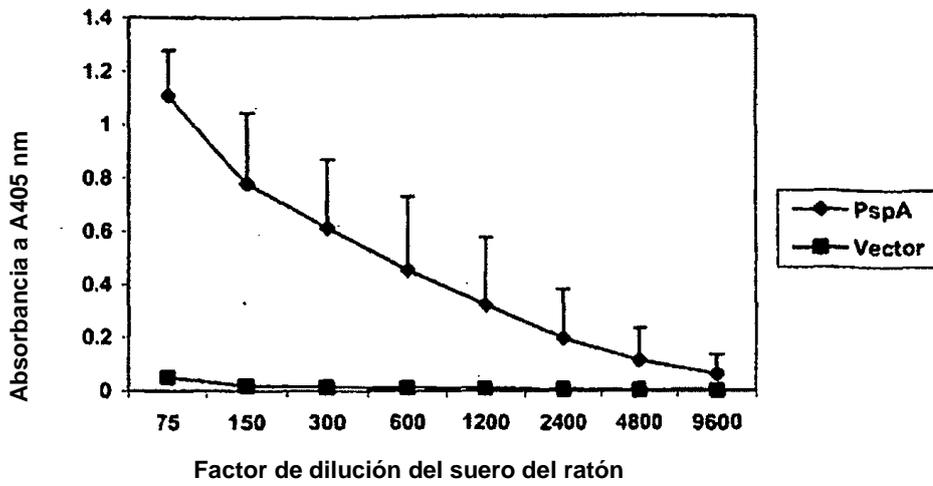


Fig. 17

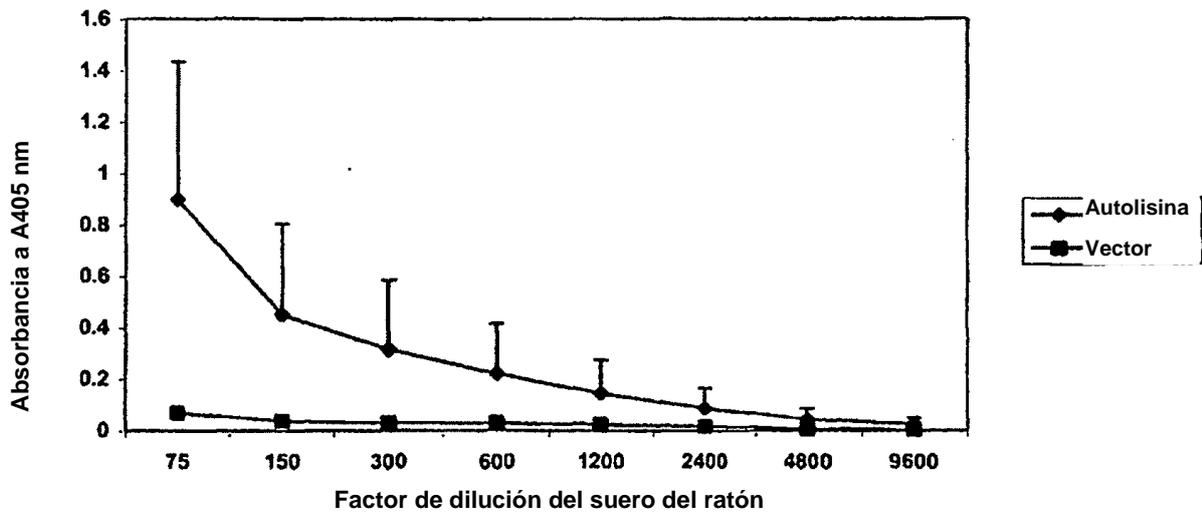


Fig. 18

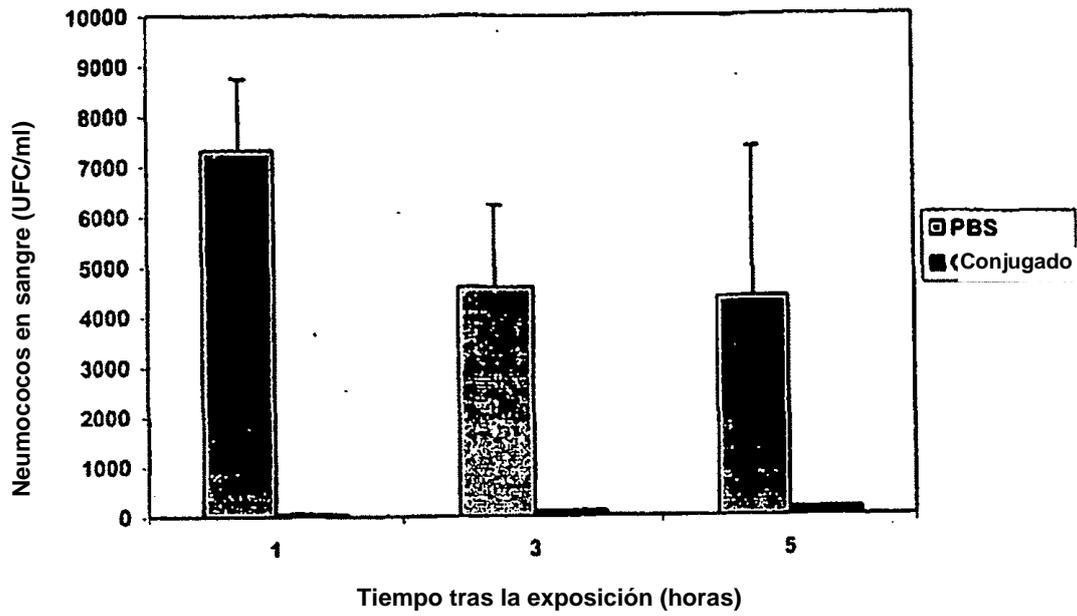


Fig. 19

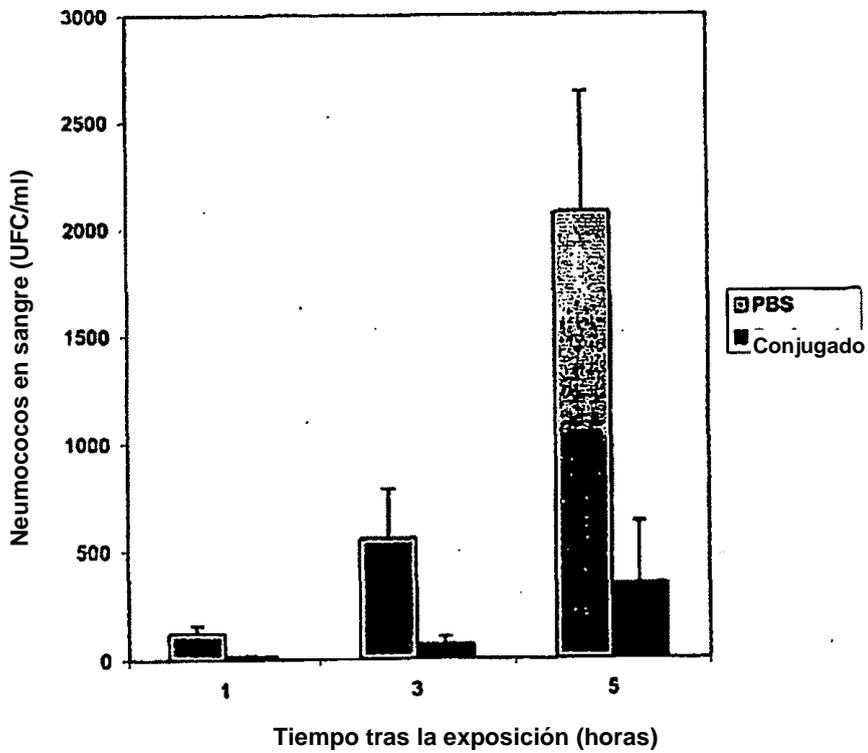


Fig. 20

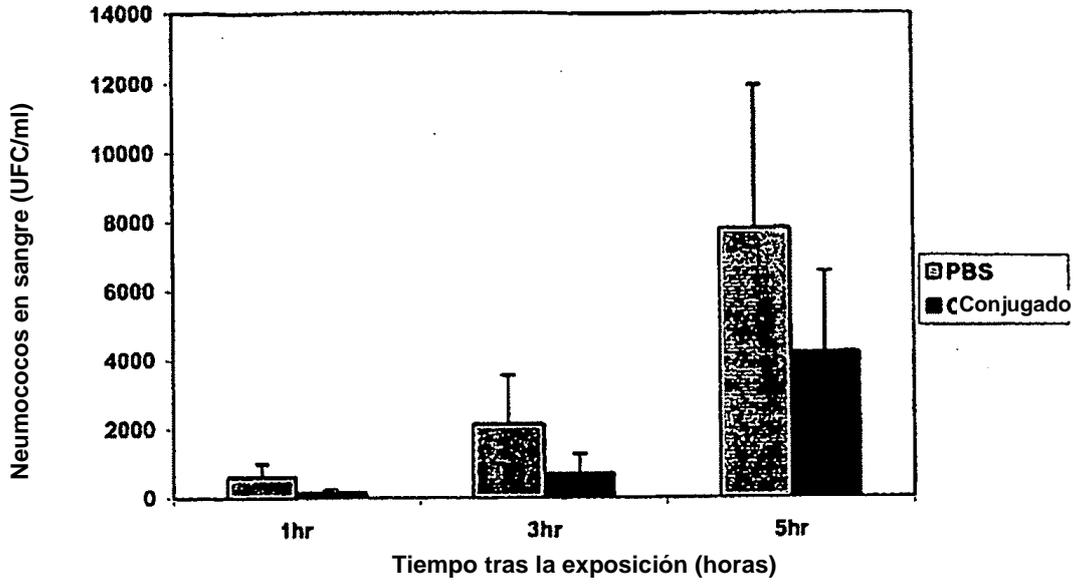


Fig. 21

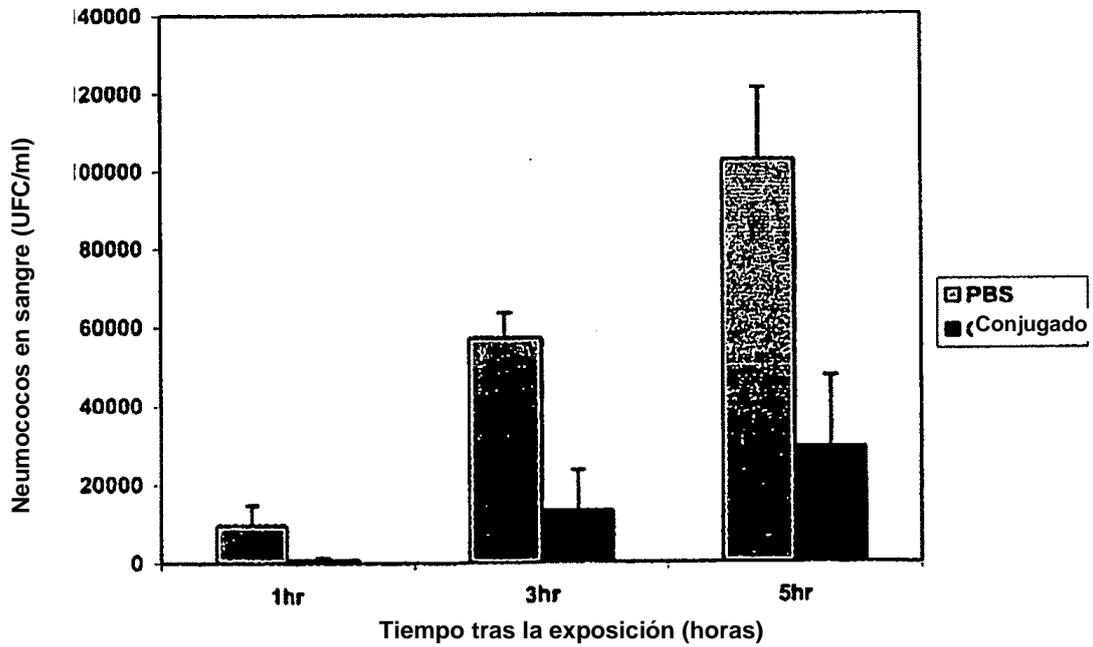
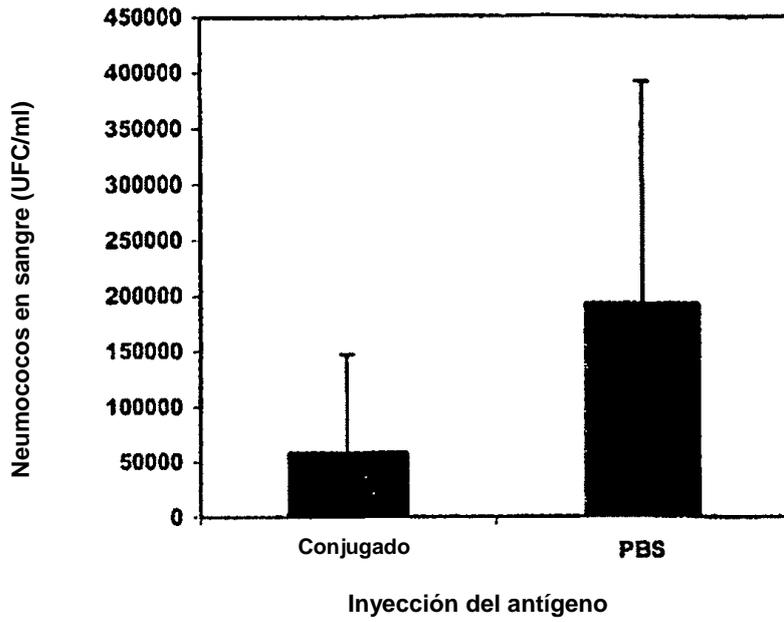
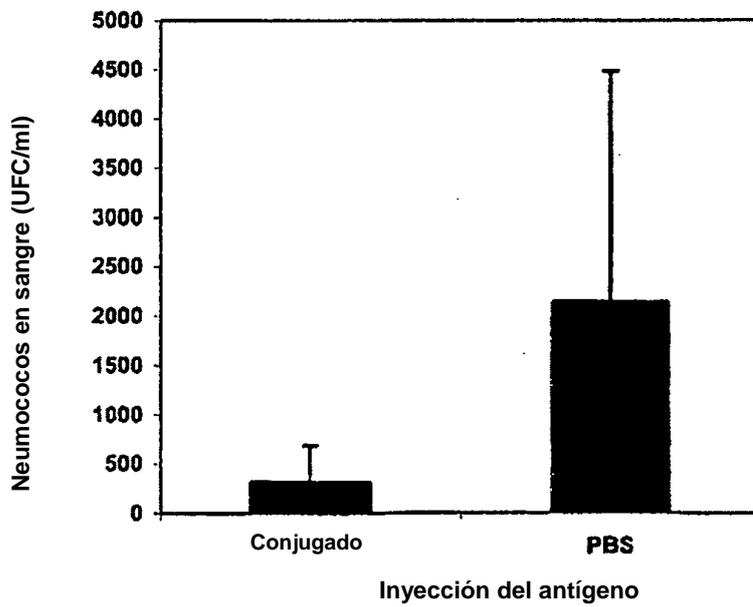


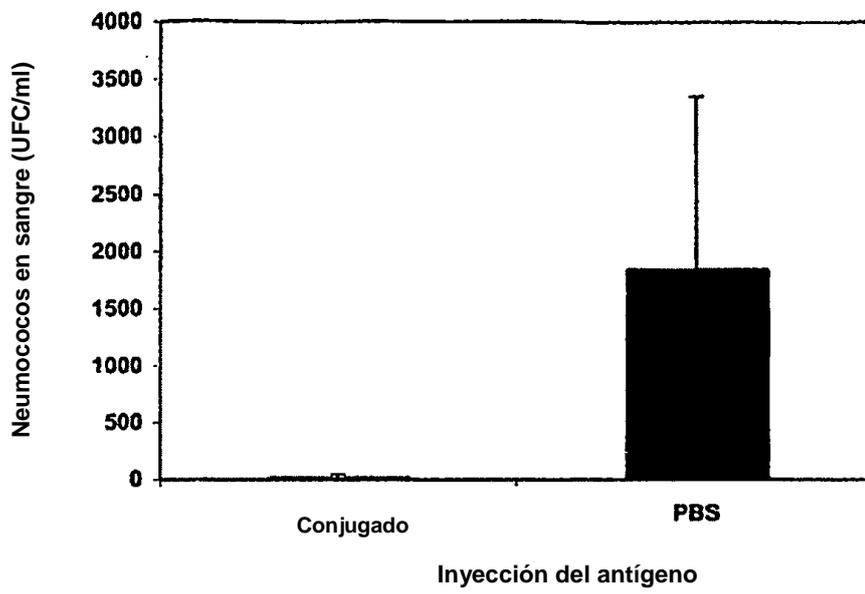
Fig. 22



**Fig. 23**



**Fig. 24**



**Fig. 25**