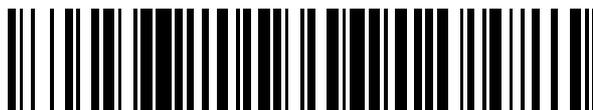


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 431**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2010** **E 10705211 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015** **EP 2538971**

54 Título: **Vacuna de combinación para Streptococcus**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.01.2016

73 Titular/es:

STICHTING KATHOLIEKE UNIVERSITEIT (100.0%)
Geert Grooteplein Noord 9
6525 EZ Nijmegen, NL

72 Inventor/es:

HERMANS, PETER WILHELMUS MARIA

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 557 431 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

Vacuna de combinación para Streptococcus

- 5 La invención se refiere al campo de la medicina, más especialmente al campo de las vacunas contra infecciones bacterianas, más en particular del género Streptococcus, más particularmente la especie *Streptococcus pneumoniae*.
- 10 *Streptococcus pneumoniae* (neumococo, *S. pneumoniae*) es un patógeno importante, que provoca una morbilidad y mortalidad significativas en todo el mundo. *S. pneumoniae* es una causa importante de enfermedades invasivas tales como la meningitis, bacteriemia y neumonía, así como enfermedades no invasivas tales como la otitis media aguda y sinusitis (i). En los niños pequeños, el neumococo es a menudo parte de la flora nasofaríngea normal. Especialmente durante los dos primeros años de vida, los niños son colonizados con nuevas cepas de neumococos. Los niños colonizados con *S. pneumoniae* desarrollan con más frecuencia otitis media aguda que los niños que no están colonizados (ii, iii, iv).
- 15 Los mecanismos moleculares precisos a través de los cuales invade el neumococo y daña tejidos de acogida no se entienden completamente. Durante muchos años, la cápsula de polisacárido ha sido reconocida en la técnica como el principal factor de virulencia y, en consecuencia, un candidato importante a vacuna (para una revisión, véase v, vi). Las estrategias actuales de vacuna neumocócica se centran en el uso de conjugados, en los que un número limitado de diferentes polisacáridos capsulares están ligados a una proteína portadora (vii, viii). Aunque los resultados de los primeros ensayos parecen prometedores, todavía surgen problemas ya que la vacunación a gran escala con el tiempo generalmente conduce a un cambio en la distribución de los serotipos hacia tipos capsulares que son poco inmunogénicas o no incluidos en la vacuna. Tal cambio se puede mejorar mediante el intercambio horizontal frecuente de genes capsulares, como lo describen varios investigadores (ix, x, xi).
- 20 En los últimos años, se ha puesto mucha atención en el papel de las proteínas neumocócicas en la patogénesis y la protección. Las proteínas que están implicadas en la patogénesis de las infecciones por *S. pneumoniae* se consideran componentes interesantes para futuras vacunas conjugadas. Tales proteínas son capaces de cambiar la respuesta inmune contra los polisacáridos presentes en la vacuna de independiente de células T a dependiente de células T, a través de lo cual la respuesta de anticuerpos hacia los polisacáridos se puede aumentar y se proporcionará una respuesta de memoria. Además, dichas proteínas deben proporcionar protección contra la colonización y la infección con cepas de *S. pneumoniae* cuyos polisacáridos capsulares no están incluidos en la vacuna.
- 25 Las capacidades de protección de diferentes proteínas (virulencia) han sido investigadas previamente. La inmunización de neumolisina (xii), la proteína A de superficie neumocócica (PspA) (xiii, xiv, xv), la adhesina A de superficie neumocócica (PsaA) (xvi), y la neuraminidasa (xvii) confieren claramente protección en animales.
- 30 En la literatura han sido reportados diversos polinucleótidos de *S. pneumoniae* y los polipéptidos predichos que son codificados por dichos nucleótidos y se ha contemplado el uso de estos compuestos en vacunas y en preparaciones medicinales, por ejemplo en los documentos WO 97/37026, WO 00/06737 y WO 98/18930. Estas publicaciones, sin embargo, no identifican ninguna proteína funcional y mucho menos una vacuna basada en una proteína funcional. Estas publicaciones tampoco dicen nada con respecto a las proteínas que cuando se usan en vacunas son capaces de provocar una respuesta inmune y mucho menos que son capaces de provocar alguna actividad protectora
- 35 En el documento de Cron y colaboradores (Antonie van Leeuwenhoek 95: 43-43, 2009) se menciona que SP2205 es una proteína de superficie expuesta y un objetivo interesante para su inclusión en vacunas de proteína. Además, se ha divulgado que las proteínas SP1298 y SP2205 son ejemplos de la familia DHH. Sin embargo, no se proporcionan datos de una preparación inmunogénica de combinación con cualquiera de estas proteínas.
- 40 Actualmente se encuentra disponible una vacuna polisacárida para 23 serotipos bacterianos (Pneumovax 23^{MR}, Merck, EE.UU.) y una vacuna neumocócica conjugada para 7 serotipos (Prevenar^{MR}, Wyeth, EE.UU.) que proporciona una buena protección inmunológica. Sin embargo, existen limitaciones con estas vacunas. Tanto la vacuna polisacárida como la conjugada sólo protegen contra los serotipos del tipo de la vacuna, permitiendo que ocurra el reemplazo de serotipos que no son de la vacuna. Este reemplazo de serotipos y la enfermedad posterior ha enfatizado la necesidad de estrategias alternativas de vacunas.
- 45 El mundo está requiriendo una vacuna efectiva de bajo costo, que idealmente proporcionaría protección inmunológica contra todos los serotipos de neumococo, la colonización neumocócica y la enfermedad invasiva. La vacuna sería inmunogénica en todos los grupos de edad y provocaría una respuesta que puede ser reforzada.
- 50 La presente invención identifica una vacuna proteica de múltiples componentes que abarca varias proteínas neumocócicas conservadas que han mostrado algún grado de protección en modelos murinos como nuevos candidatos de vacunas.
- 55
- 60
- 65

Ahora se ha encontrado que una combinación de dos proteínas de *S. pneumoniae* puede ser utilizada en la preparación de una vacuna contra microorganismos y especialmente *S. pneumoniae*. Estas proteínas se encuentran entre un gran grupo de proteínas que se detectaron durante una criba de selección negativa en todo el genoma para factores bacterianos que contribuyen a la colonización, bacteriemia y meningitis *in vivo* (WO 2008/127094 y PCT/NL2009/050600).

En consecuencia, la invención se refiere a una composición inmunológica, o composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1. La invención también se refiere al uso de estas proteínas o fragmentos de las mismas para la preparación de una vacuna para el tratamiento de una infección por *S. pneumoniae* y/o colonización, y al uso de estas proteínas o fragmentos de las mismas o proteínas recombinantes o sintéticas o fragmentos o proteínas funcionalmente homólogas o fragmentos de las mismas como un portador para inducir protección profiláctica contra otros microorganismos, incluidos los virus.

En esta descripción y las reivindicaciones adjuntas el tratamiento abarca y en general es la profilaxis de infecciones.

El término "fragmento funcional" se refiere a una versión acortada de la proteína, que es una variante funcional o un derivado funcional. Una "variante funcional" o un "derivado funcional" de una proteína es una proteína cuya secuencia de aminoácidos puede derivarse de la secuencia de aminoácidos de la proteína original por la sustitución, supresión y/o adición de uno o más residuos de aminoácidos de una forma que, a pesar del cambio en la secuencia de aminoácidos, la variante funcional retiene al menos una parte de al menos una de las actividades biológicas de la proteína original que es detectable por una persona ordinariamente capacitada en la técnica. Una variante funcional es generalmente al menos 70% homóloga e incluso más ventajosamente al menos 80 o 90% homóloga a la proteína de la cual se puede derivar. "Funcional" como se usa en la presente memoria significa funcional en las bacterias *Streptococcus pneumoniae* y capaces de provocar anticuerpos que proporcionan protección contra la enfermedad causada por dicha bacteria.

La expresión "sustituciones conservadoras" tal como se utiliza con respecto a los aminoácidos se refiere a la sustitución de un aminoácido dado por un aminoácido que tiene características fisicoquímicas de la misma clase. Por lo tanto, cuando un aminoácido de las proteínas SP1298 y/o SP2205 tiene un grupo de característica hidrófoba, una sustitución conservadora lo reemplaza por otro aminoácido que tiene también un grupo de característica hidrófoba; otras de tales clases son aquellos en las que el grupo que caracteriza es hidrofílico, catiónico, aniónico o contiene un tiol o un tioéter. Tales sustituciones son bien conocidas por aquellos ordinariamente capacitados en la técnica, es decir, véase la patente de los Estados Unidos No. 5.380.712. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos se pueden hacer, por ejemplo, dentro del grupo de aminoácidos alifáticos no polares (Gly, Ala, Pro, Ile, Leu, Val), el grupo de aminoácidos polares no cargados (Cys, Ser, Thr, Met, Asn, Gln), el grupo de ácidos aminoácidos polares cargados (Asp, Glu, Lys, Arg) o el grupo de aminoácidos aromáticos (His, Phe, Tyr, Trp).

El término "parte inmunogénica" incluye la referencia a cualquier parte de una proteína SP1298 y/o SP2205, o un homólogo funcional o fragmento funcional del mismo, que es capaz de provocar una respuesta inmune en un mamífero. Dicha parte inmunogénica corresponde preferiblemente a un determinante antigénico de dicho patógeno.

Tal como se utiliza aquí, el término "antígeno" se refiere a una molécula capaz de ser enlazada por un anticuerpo o un receptor de células T (RCT) si es presentado por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). El término "antígeno", como se usa aquí, también abarca los epítomos de células T. Un epítomo de células T es reconocido por un receptor de células T en el contexto de un CMH de clase I, presente en todas las células del cuerpo excepto los eritrocitos, o clase II, presente en las células inmunes y, en particular células presentadoras de antígeno. Este evento de reconocimiento conduce a la activación de las células T y mecanismos efectores posteriores tales como proliferación de las células T, secreción de citoquinas, secreción de perforina, etc. Un antígeno adicionalmente puede ser reconocido por el sistema inmune y/o puede inducir una respuesta inmune humoral y/o respuesta inmune celular que conduce a la activación de linfocitos T y/o B. Esto puede, sin embargo, requerir que, al menos en ciertos casos, el antígeno contenga o esté enlazado a un epítomo de células T cooperadoras y se presente en un adyuvante. Un antígeno puede tener uno o más epítomos (epítomos B y T). La reacción específica mencionada anteriormente pretende indicar que el antígeno reaccionará preferiblemente, típicamente de una forma altamente selectiva, con su correspondiente anticuerpo o RCT y no con la multitud de otros anticuerpos o RCT que pueden ser evocados por otros antígenos. Los antígenos en la presente memoria también pueden ser mezclas de varios antígenos individuales. Los antígenos, como se usan en este documento, incluyen antígenos de enfermedades infecciosas, más especialmente antígenos de *Streptococcus pneumoniae*, más preferiblemente antígenos derivados de las proteínas SP1298 y/o SP2205 y fragmentos y derivados de las mismas.

Tal como se utiliza aquí, el término "determinante antigénico" se entiende que se refiere a aquella porción de un antígeno que es específicamente reconocida ya sea por linfocitos T o por linfocitos B. Los linfocitos B responden a determinantes antigénicos foráneos a través de la producción de anticuerpos, mientras que los linfocitos T son los mediadores de la inmunidad celular. Por lo tanto, los determinantes antigénicos o epítomos son aquellas partes de un antígeno que son reconocidas por anticuerpos, o en el contexto de un CMH, por los receptores de células T. Un determinante antigénico puede contener uno o más epítomos.

El término "tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección por *Streptococcus pneumoniae*" o "tratamiento profiláctico o terapéutico de una infección neumocócica" se refiere tanto a tratamientos profilácticos como terapéuticos en donde la virulencia del patógeno es bloqueada o disminuida, pero también a los tratamientos en donde los anticuerpos contra las proteínas SP1298 y/o SP2205 reconocen las bacteria y protegerán al huésped contra la infección, ya sea directamente a través de agotamiento inmunitario, o indirectamente mediante el bloqueo de la actividad de la proteína, inhibiendo así el crecimiento de las bacterias. Además, el término se refiere al bloqueo de la función de las proteínas SP1298 y/o SP2205 *in vivo* reduciendo de este modo las capacidades de adhesión del patógeno con una reducción concomitante en la capacidad de colonización y de invasión. Por lo tanto, el término incluye la inducción de respuestas inmunes en los sujetos que utilizan formulaciones de vacunas de la invención, así como la inhibición del crecimiento del patógeno *in vivo* mediante el uso de anticuerpos de la presente invención como un compuesto activo en una composición farmacéutica administrada al sujeto. También se incluye la inhibición de la virulencia y/o el crecimiento de las bacterias mediante tratamiento con antibióticos.

El término "anticuerpo" se refiere a moléculas que son capaces de enlazarse a un epítipo o determinante antigénico e incluye referencia a formas de enlazamiento al antígeno de los anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab)2). El término "anticuerpo" con frecuencia se refiere a un polipéptido codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos que se enlazan y reconocen específicamente un analito (antígeno). Sin embargo, aunque se pueden definir varios fragmentos de anticuerpos en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, una persona normalmente capacitada se dará cuenta que tales fragmentos pueden ser sintetizado nuevamente bien sea químicamente o mediante la utilización de metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa aquí, también incluye fragmentos de anticuerpo tales como Fv de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos (es decir, que comprenden regiones constantes y variables de diferentes especies), anticuerpos humanizados (es decir, que comprenden una región determinante de complementariedad (RDC) de una fuente no humana) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y puede prepararse por técnicas que son bien conocidas en el arte tales como inmunización de un huésped y recolección de sueros (policlonal) (véase, por ejemplo, Parker, Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., EE.UU., 1976), Butler, J. Immunol. Meth. 7, 1-24 (1975); Broughton y Strong, Clin. Chem. 22, 726-732 (1976); y Playfair, y colaboradores, Br. Med. Bull. 30, 24-31 (1974)) o mediante la preparación de líneas celulares híbridas continuas y recolectando la proteína secretada (monoclonal) (véase, por ejemplo, Kohler y colaboradores en Nature 256, 495-497 (1975) y Eur. J. Immunol. 6, 511-519 (1976); por Milstein y colaboradores, Nature 266, 550-552 (1977); y por Walsh, Nature 266, 495 (1977)) o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones sometidas a mutagénesis de los mismos que codifican al menos las secuencias de aminoácidos requeridas para el enlazamiento específico de anticuerpos naturales. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o fragmento de la misma, en donde las inmunoglobulinas incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Fragmentos de los mismos pueden incluir Fab, Fv y F(ab')2, Fab', y similares. Además, agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos pueden ser utilizados cuando sea apropiado siempre y cuando se mantenga la afinidad de enlazamiento por una molécula particular.

Tal como se utiliza aquí, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a una composición de anticuerpo que tiene una población homogénea de anticuerpos. El término no está limitado en cuanto a la especie o fuente del anticuerpo, ni se pretende que esté limitado por la forma en que se elabora. El término abarca inmunoglobulinas enteras así como fragmentos tales como Fab, F(ab')2, Fv, y otros, tales como fragmentos de la RDC, que retienen la función de enlazamiento al antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales de cualquier especie de mamífero se pueden utilizar en esta invención. En la práctica, sin embargo, los anticuerpos serán típicamente de origen murino o de rata debido a la disponibilidad de líneas celulares de rata o de murino para uso en la elaboración de las líneas celulares híbridas requeridas o hibridomas para producir anticuerpos monoclonales.

Como se usa en este documento, el término "anticuerpos monoclonales humanizados" significa que al menos una porción de los aminoácidos expuestos en las regiones marco del anticuerpo (o fragmento), que no coinciden con los aminoácidos correspondientes en las contrapartes humanas más homólogas, se cambian, tal como mediante mutagénesis dirigida al sitio del ADN que codifica el anticuerpo. Debido a que estos aminoácidos expuestos están en la superficie de la molécula, esta técnica se llama remodelación superficial. Por otra parte, debido a que los aminoácidos en la superficie de la molécula son aquellos que más probablemente den lugar a una respuesta inmune, esta remodelación superficial disminuye la inmunogenicidad del anticuerpo monoclonal cuando se administra a una especie cuya línea celular no se utilizó para generar el anticuerpo, tal como la humana. El término "anticuerpo monoclonal humanizado" también incluye un anticuerpo quimérico en donde las regiones variables ligera y pesada de un anticuerpo monoclonal generado por un hibridoma de una línea celular no humana son cada una unidas, a través de tecnología recombinante, a una región constante de cadena ligera humana y al menos una región constante de cadena pesada, respectivamente. La preparación de tales anticuerpos quiméricos (es decir, humanizados) es bien conocida en la técnica.

El término "que reconoce específicamente", incluye la referencia a una reacción de enlazamiento entre un anticuerpo y una proteína que tiene un epítipo reconocido por el sitio de enlazamiento del antígeno del anticuerpo. Esta reacción de enlazamiento es determinante de la presencia de una proteína que tiene el epítipo reconocido entre la presencia de una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. El enlazamiento específico a

5 un anticuerpo bajo tales condiciones puede requerir un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, los anticuerpos producidos contra las proteínas SP1298 y/o SP2205 de la presente invención se pueden seleccionar para obtener anticuerpos que reconocen específicamente dichas proteínas. Las proteínas utilizadas como inmunógenos pueden estar en conformación nativa o desnaturalizada a fin de proporcionar un epítipo lineal. Se pueden utilizar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que reconocen específicamente una proteína en particular (u otro analito). Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se utilizan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (1988), para una descripción de los formatos de inmunoensayo y de las condiciones que se pueden utilizar para determinar la reactividad selectiva.

10 Un "sujeto" como se denomina en este documento se entiende que incluye mamíferos y otros animales, en donde los mamíferos incluyen, por ejemplo, seres humanos, simios, monos, caballos, ganado, cerdos, cabras, perros, gatos, ratas, ratones y ovejas. El término "animal no humano" significa que no incluye a los seres humanos. Preferiblemente, en la presente invención, el sujeto es un ser humano, más preferiblemente un niño o una persona mayor.

20 Las proteínas SP1298 y SP2205 tienen una secuencia de aminoácidos según lo previsto en la Fig. 1. Las proteínas SP1298 y SP2205 de la presente invención han sido identificadas mediante huella genética de arreglo genómico (GAF), que es un método de alto rendimiento para identificar genes condicionalmente esenciales en *Streptococcus pneumoniae* mediante el uso de una combinación de mutagénesis de transposones al azar y tecnología de microarreglos (véase Bijlsma, JJE y colaboradores, 2007, *Appl. Environm. Microbiol.* 73 (5): 1514-1524, y el documento WO 2008/127094). GAF detecta los sitios de inserción del transposón en una biblioteca de mutantes mediante amplificación y marcación del ADN cromosómico adyacente al transposón y posterior hibridación de estas sondas con un microarreglo. La identificación de los sitios de inserción de transposones en mutantes que han desaparecido de la biblioteca debido a la selección, que representa genes condicionalmente esenciales, se logra mediante la hibridación diferencial de las sondas generadas a partir de la biblioteca cultivada bajo dos condiciones para un arreglo. Para la detección de genes esenciales para colonización nasofaríngea y/o diseminación hacia y/o supervivencia en la sangre, se usaron bibliotecas de mutantes de *Streptococcus pneumoniae* para infectar ratones en un modelo de infección por neumonía en murinos. Para la detección específica de genes esenciales para la colonización nasofaríngea, se utilizaron bibliotecas de mutantes de *Streptococcus pneumoniae* para infectar ratones en un modelo de infección de colonización en murinos. Para la detección específica de genes esenciales para supervivencia en la sangre, se usaron bibliotecas de mutantes de *Streptococcus pneumoniae* para infectar ratones en un modelo de infección por bacteriemia en murinos. Después de la exposición, se identificaron los mutantes que había desaparecido del lavado nasofaríngeo y/o de las muestras de sangre tomadas de los ratones, y se identificaron los genes alterados de estos mutantes. SP1298 y SP2205 se encontraban entre las proteínas que habían sido identificadas como candidatas para el desarrollo de vacunas.

40 Se ha encontrado ahora sorprendentemente que una combinación de ambas proteínas es más efectiva en el desarrollo de una respuesta inmunológica que las proteínas individuales.

45 En una realización preferida de la invención, las proteínas o un fragmento(s) de las mismas utilizadas en la preparación de la vacuna, son SP1298 o un fragmento homólogo (funcional) de la misma de *S. pneumoniae* y SP2205 o un fragmento homólogo (funcional) de la misma de *S. pneumoniae*. Además, dicha vacuna puede comprender otras proteínas inmunogénicas, tales como cualquiera de las proteínas enumeradas en los documentos WO 2008/127094 y PCT/NL2009/ 050600.

50 Igualmente es posible emplear un fragmento de SP1298 y/o SP2205 para la preparación de una vacuna. Un fragmento es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es funcionalmente similar a la correspondiente sección de la proteína. Un fragmento preferido es un oligopéptido que contiene una de las partes caracterizadoras o dominios activos de la proteína. Las proteínas o los fragmentos funcionales de las mismas pueden obtenerse mediante técnicas recombinantes o mediante síntesis química. Los oligopéptidos sintéticos basados en o derivados de SP1298 y/o SP2205 puede por ejemplo ser obtenidos por tecnología Pepscan convencional. Una persona capacitada en la materia puede preparar fácilmente fragmentos o proteínas homólogas de ambas SP1298 y/o SP2205. Además, la aplicabilidad de estos fragmentos o proteínas homólogas para proporcionar una respuesta inmunológica a la infección por *S. pneumoniae* puede ser probada fácilmente por la persona capacitada en la materia, por ejemplo, mediante la realización de experimentos tales como los descritos en la sección experimental a continuación.

60 Las proteínas o fragmentos (funcionales) que se utilizan en la preparación de la vacuna pueden ser proteínas parcialmente purificadas, proteínas purificadas o fragmentos de SP1298 y/o SP2205.

65 A fin de obtener una vacuna que se pueda administrar, la proteína o proteínas o fragmentos se ponen en una forma que sea adecuada para este propósito. Con este fin, la(s) proteína(s) puede(n) ser conjugada(s) con una proteína portadora. Las proteínas portadoras que se pueden utilizar en esta invención son en general portadores convencionales y como tales son bien conocidas en la técnica. La vacuna puede igualmente comprender también

adyuvantes y otros componentes adicionales para garantizar aún más el buen funcionamiento de la vacuna. Estos componentes adicionales son generalmente conocidos por la persona normalmente capacitada.

5 En una realización preferida de la invención, la composición que comprende la(s) proteína(s) o el(los) fragmento(s) están por tanto, combinados con un adyuvante y/o un portador. A partir de esta composición se prepara una vacuna que se utiliza en la vacunación preventiva contra *S. pneumoniae*.

10 La invención proporciona además un método para la preparación de una vacuna contra *S. pneumoniae*. El método comprende las etapas de preparar o aislar la proteína o el fragmento u homólogo u homólogo funcional de la proteína o fragmento, la determinación de la respuesta inmunogénica mediante el aumento de anticuerpos contra la proteína o el fragmento u homólogo u homólogo funcional de la proteína o fragmento y analizar los anticuerpos por la actividad. El método de acuerdo con la invención también abarca la producción recombinante o sintética de la proteína o el fragmento u homólogo u homólogo funcional de la proteína o fragmento y las etapas posteriores para la preparación de la vacuna.

15 Los antígenos de la vacuna de esta invención se administran en una concentración que es terapéuticamente efectiva para prevenir o tratar infecciones por *Streptococcus pneumoniae*. Para lograr este objetivo, las vacunas pueden formularse usando una variedad de excipientes aceptables conocidos en la técnica. Típicamente, las vacunas se administran mediante inyección, ya sea por vía intravenosa o por vía intraperitoneal. Los métodos para llevar a cabo esta administración son conocidos por aquellos normalmente capacitados en la técnica.

20 Preferiblemente, la vacuna contiene al menos 5-150 µg de masa antigénica por dosis, más preferiblemente 50-100 µg y lo más preferible 80 µg por dosis. Siendo la masa antigénica la masa de la proteína antigénica. Podrían ser incluso preparadas vacunas de acuerdo con la presente invención con una masa antigénica de hasta 275 µg por dosis, y tales vacunas aún no pueden provocar reacciones locales en el sitio de la inyección. Por supuesto, se pueden colocar incluso más microgramos de antígeno en una dosis de vacuna de una vacuna de acuerdo con la invención, pero si la protección obtenida con la vacuna no se mejora con una dosis más alta, el aumento de la carga antigénica sólo trae como resultado una vacuna más costosa de lo necesario. Además, un aumento de la dosis de antígeno puede eventualmente conducir a reacciones locales inaceptables en el sitio de inyección, que se deben evitar.

25 Una vacuna de acuerdo con la invención puede contener una proteína SP1298 o SP2205 (parcialmente) purificada o recombinante o un fragmento funcional de las mismas, donde dicha proteína recombinante es producida preferiblemente por medio de la expresión de un vector de expresión en células huésped adecuadas, conteniendo dicho vector de expresión la secuencia del gen o una parte inmunogénica del mismo bajo el control de un promotor adecuado. Varios sistemas de expresión adecuados son conocidos en la técnica y se pueden utilizar en un método para preparar una vacuna de acuerdo con la invención.

30 Una vacuna de acuerdo con la invención puede comprender además un adyuvante adecuado. Muchos sistemas adyuvantes son conocidos en la técnica, por ejemplo se utilizan comúnmente sistemas adyuvantes de aceite en agua. Cualquier aceite adecuado puede ser utilizado, por ejemplo un aceite mineral conocido en la técnica para uso en adyuvantes. La fase oleosa también puede contener una mezcla adecuada de diferentes aceites, ya sea minerales o no minerales. Los adyuvantes adecuados pueden comprender también vitamina E, opcionalmente mezclada con uno o más aceites. La fase acuosa de una vacuna con adyuvante de aceite en agua contendrá el material antigénico. Las formulaciones adecuadas usualmente comprenden aproximadamente 25-60% de fase oleosa (40-75% de fase acuosa). Ejemplos de formulaciones adecuadas pueden comprender 30% de fase acuosa y 70% de fase oleosa o 50% de cada uno. Se prefiere especialmente una vacuna no recombinante a base de lactococos que presenta las proteínas antigénicas neumocócicas mencionadas aquí o fragmentos de la mismas. Las partículas con forma de bacterias derivadas de lactococos no están vivas y se denominan partículas de matriz reforzadora Gram positivas (GEM) (Van Roosmalen, ML y colaboradores, 2006, Methods 38: 144-149). Estas partículas GEM no cuentan con proteínas de superficie y el contenido intracelular está en gran medida degradado (Bosma, T. y colaboradores, 2006, Appl. Environ. Microbiol. 72: 880-889). Las partículas GEM se pueden utilizar como vehículo de anclaje y suministro para las proteínas neumocócicas (véase Audouy, SAL y colaboradores, 2007, Vaccine 25 (13): 2497).

35 Las formulaciones de vacunas de la presente invención pueden usarse en métodos profilácticos de la invención para la inmunización de un sujeto mediante la introducción de dichas formulaciones en dicho sujeto por vía subcutánea, intramuscular, intranasal, intradérmica, intravenosa, transdérmica, transmucosa, oral, o directamente en un ganglio linfático. En otra realización, la composición se puede aplicar localmente, cerca de un depósito local de patógeno contra el cual se desearía vacunar.

40 La presente invención proporciona además un método para la fabricación de una vacuna destinada a la protección de un sujeto contra una infección neumocócica, en donde dicha vacuna se combina con un diluyente farmacéuticamente aceptable, vehículo, excipiente o adyuvante para la misma, de tal manera que se proporciona una formulación que puede proveer una dosis de al menos 20 µg de proteína en un solo evento de administración.

Una vacuna (preparada por un método) de acuerdo con la invención puede ser utilizada en un método para proteger a un sujeto contra una infección neumocócica.

Para garantizar una adecuada protección, se administra la vacuna preferiblemente en un régimen de vacunación de 2 dosis, para lo cual se administran la primera dosis (vacunación de cebado) y la segunda dosis (vacunación de refuerzo) al sujeto con un intervalo de aproximadamente 3 semanas. De esta forma el sujeto habrá obtenido una protección completa contra la infección neumocócica. La vacunación es muy favorable para los niños pequeños.

Descripción de las figuras:

Figura 1: Secuencias de aminoácidos (AA) de SP1298 (311 AA; parte superior) y SP2205 (657 AA; parte inferior). La conservación del dominio consenso DHH (pfam01368) en ambas proteínas se indica con negrita, y la conservación del dominio de consenso asociado a DHH (DHHA1) (pfam02272) en cursiva. Los dominios transmembrana (primeros 50 AA) eliminados por la expresión de SP2205 se indican mediante caracteres pequeños (es decir, sin mayúsculas).

Figura 2: Contribución de las proteínas a la adhesión a las células epiteliales faríngeas humana Detroit 562. Barra de la izquierda: *S. pneumoniae* de tipo silvestre, barra del medio SP1298 mutante y barra de la derecha SP2205 mutante. La adhesión se expresa en relación con el de tipo silvestre, y los ambientes de las diferentes cepas utilizadas se indican debajo del eje x.

Figura 3: Carga bacteriana en el modelo de colonización de infección única y experimentos de coinfección en ratones.

Figura 4: Carga bacteriana en el modelo de neumonía de infección única y experimentos de coinfección en ratones. Concentración en el tejido pulmonar, en lavado del pulmón (BAL) y en sangre.

Figura 5: Carga bacteriana en el modelo de bacteriemia de infección única y experimentos de coinfección en ratones.

Figura 6: Carga bacteriana tras la vacunación con una o ambas proteínas recombinantes en comparación con los controles positivos Prevenar^{MR} y PspA y con un control negativo (alumbre) después de la exposición a TIGR4 de tipo silvestre.

Ejemplos

Materiales y métodos

Construcción de mutantes de supresión dirigidos. Se empleó un método de PCR con megacebador para reemplazar genes objetivo en el genoma de las cepas TIGR4, D39, y SME215 de *S. pneumoniae* con el casete de resistencia a espectinomocina del plásmido pR412T7 (Bijlsma, JJE y colaboradores, 2007, Appl. Environm. Microbiol. 73(5): 1514-1524). En la primera etapa, el casete de resistencia a espectinomocina y las dos regiones de flanco del gen objetivo se amplificaron por PCR utilizando el plásmido pR412T7 o ADN cromosómico aislado de una de las tres cepas de neumococo como plantilla, respectivamente. Las regiones de flanco eran de aproximadamente 500 pb de longitud y contenían menos de 150 pb de la secuencia codificante del gen objetivo. Para cada región de flanco, el cebador más cercano al gen objetivo contenía una secuencia adicional complementaria a un cebador del casete de espectinomocina. En la segunda etapa, los productos de la PCR de las dos regiones de flanco se fusionaron con el casete de resistencia a espectinomocina por medio de PCR de extensión del solapamiento, lo que conduce a la incorporación del casete de resistencia a espectinomocina entre las dos regiones de flanco del gen objetivo. El producto resultante de la PCR se transformó en la cepa correspondiente de la siguiente forma.

En primer lugar, se prepararon poblaciones de células de *S. pneumoniae* precompetentes. En pocas palabras, se inocularon medio cCAT (10 g litro⁻¹ de ácidos Casamino (Difco), 5 g litro⁻¹ de triptona (Difco), 10 g litro⁻¹ de extracto de levadura (Difco), 5 g litro⁻¹ de NaCl, K₂P0₄ 16 mM, glucosa al 0,2%, y 0,15 g litro⁻¹ de glutamina) con varias colonias y se cultivaron hasta una densidad óptica a 620 nm (DO₆₂₀) de 0,25-0,3. Después de una dilución de 30 veces del cultivo en medio CTM (medio cCAT complementado con albúmina de suero bovino al 0,2% y CaCl₂ 1 mM), las células se desarrollaron hasta una DO₆₂₀ de 0,1, se sedimentaron, se resuspendieron en 0,1 volúmenes de CTM-pH 7,8 (CTM ajustado a pH 7,8 con NaOH) que contenía glicerol al 15% y se almacenó a -80°C. Para la transformación, se cultivaron células TIGR4, D39 o SME215 precompetentes durante 15 minutos a 37°C en un volumen de 10 veces de CTM-pH 7,8 complementado con 100 ng/ml de CSP (CSP-1 para D39 y SME215, CSP-2 para TIGR4). Después de la adición de ADN, se incubaron los cultivos durante 30 min a 32°C, seguido de una incubación de dos horas a 37°C. Después del crecimiento durante la noche en placas selectivas que contenían 150 µg/ml de espectinomocina, se recolectaron los transformantes individuales de las placas, se reunieron, crecieron en fase semilogarítmica en 20 ml de medio GM17 complementado con espectinomocina, y se almacenó a -80°C. Los transformantes se seleccionaron con base en la resistencia a la espectinomocina y se controlaron mediante PCR para la recombinación en el lugar deseado en el cromosoma. Además, se generó un mutante doble ΔSP1298ΔSP2205 en cada una de las tres cepas de neumococo. Con este fin, se inactivó el gen para SP1298 mediante reemplazo alélico con un casete de trimetoprima como se describió anteriormente, y se introdujo en las cepas ΔSP2205 respectivas (espectinomocina) mediante transformación.

Construcción del plásmido y producción de SP1298 etiquetada con His. Se amplificó mediante PCR el gen para SP1298 de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae* con los pares cebadores oligonucleótidos LCSP1298XbaI_{H6F} y

LCSP1298BamR y se clonaron en el vector de clonación pCR2.1 del kit de clonación TA (Invitrogen) para obtener pLC1298. En la siguiente etapa, se cortó el gen para SP1298 por digestión con XbaI y BamHI y luego se subclonó en el vector plásmido de expresión pET11c (Novagen) para obtener pLC1298XbaI_#1. La secuencia de nucleótidos del gen clonado para SP1298 fue confirmada por secuenciación.

5 Para la producción de SP21298 etiquetada con His, se diluyeron 50 veces cultivos de una noche de *E. coli* BL21 (pLC1298XbaI_#1) en 2x LB precalentado (37°C) complementado con glucosa al 0,5% y 100 µg/ml de ampicilina. A una DO₆₀₀ entre 0,6 y 0,8, se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,1 mM. Después de 2 horas, se sedimentaron las células, se resuspendieron en regulador de lisis (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,4, e imidazol 10 mM) a una DO₆₀₀ equivalente a 100, y se lisaron por sonicación. El residuo insoluble en el lisado se separó mediante ultracentrifugación a 40.000 rpm durante 60 min. El sobrenadante resultante se cargó en una columna de 1 ml HiTrap Chelating HP (Amersham Biosciences) con níquel para la purificación, se eluyó con imidazol 300 mM y las fracciones que contenían SP1298 se dializaron contra Hepes 10 mM. Después de la diálisis, se liofilizó rHisSP1298 y se almacenó a -20°C hasta su uso posterior. La identidad de la proteína purificada se confirmó por análisis MALDI-TOF, y se determinó la concentración mediante el ensayo del ácido bicinonínico (Bio-Rad).

20 Construcción del plásmido y producción de SP2205 etiquetado con His. El gen para SP2205 de la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae* se amplificó por PCR con LCSP2205AvrH6F y LCSP2205BamR y se clonó en el vector de clonación pCR2.1 del kit de clonación TA (Invitrogen) para obtener pLC2205. En la siguiente etapa, se escindió el gen para SP2205 mediante digestión con BamHI y AvrII y posteriormente se subclonó en el vector plásmido de expresión pET11c (Novagen) para obtener pLC2205_6. La secuencia de nucleótidos del gen clonado para SP2205 fue confirmada por secuenciación.

25 Para la producción de SP2205 etiquetado con His, se diluyeron 50 veces cultivos de una noche de *E. coli* BL21 (pLC2205_6) en 2x LB precalentado (37°C) complementado con glucosa al 0,5% y 100 µg/ml de ampicilina. A una DO₆₀₀ entre 0,6 y 0,8, se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,1 mM. Después de 2 horas, se sedimentaron las células, se resuspendieron en regulador de lisis (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 0,5 M, pH 7,4, Imidazol 10 mM, urea 6 M, PMSF 1 mM, y Triton X-100 al 10%) a una DO₆₀₀ equivalente a 100. Antes de la sonicación, se añadieron PMSF 100 mM, BZA 100 mM, y lisozima al sedimento de SP2205 para mejorar la lisis. Se removió cualquier residuo insoluble adicional en el lisado mediante ultracentrifugación a 40.000 rpm durante 60 min. Se cargó el sobrenadante resultante en una columna de 1 ml HiTrap Chelating HP (Amersham Biosciences) con níquel para la purificación y se eluyó con imidazol 300 mM. Se dializaron las fracciones que contenían SP2205 contra Hepes 10 mM, urea 6 M, y Triton X-100 al 10%. Después de la diálisis, se almacenó rHisSP2205 en solución a -20°C hasta su uso posterior. La identidad de la proteína purificada se confirmó por análisis MALDI-TOF y se determinó la concentración mediante el ensayo del ácido bicinonínico (Bio-Rad).

40 Línea celular y cultivo celular. Se cultivó rutinariamente la línea celular epitelial humana faríngea Detroit 562 (ATCC número CCL-138) en medio RPMI 1640 sin rojo fenol (Invitrogen, Países Bajos) complementado con piruvato de sodio 1 mM y suero de ternera fetal (FCS) al 10% (v/v). Todas las células se cultivaron a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5%.

45 Ensayo de adherencia. Para los ensayos de adherencia, se cultivaron las bacterias hasta una fase exponencial media en THY y se almacenan en alícuotas de 1 ml a -80°C en THY que contenía glicerol al 15%. Antes de cada ensayo, se resuspendieron las bacterias en medio RPMI 1640 sin rojo fenol complementado con FCS al 1%. La adhesión de los neumococos a las células epiteliales se realizó como se ha descrito previamente (Bootsma HJ y colaboradores, 2007, Infect. Immun. 75: 5489-5499; Hermans P.W.M. y colaboradores, 2006, J. Biol. Chem. 281 (2): 968- 976). En resumen, se sembraron células Detroit 562 en placas de 24 pozos y se incubaron durante 48 h. Se lavaron las monocapas confluentes dos veces con PBS y se infectaron con 1x10⁷ UFC ml⁻¹ (multiplicidad de infección (MOI) de 10 (bacterias/células)) y se permitió la adhesión neumocococ a las células durante 2 h a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5%. Se removieron las bacterias no adherentes mediante tres lavados con 1 ml con PBS, después de lo cual se añadieron 200 µl de tripsina al 25%, EDTA 1 mM para desprender las células, seguido por 800 µl de Triton X-100 al 0,025% enfriado con hielo en PBS para lisar las células. Se sembraron en placa las muestras para el recuento de las UFC, y se corrigieron para tener en cuenta las pequeñas diferencias en el recuento inicial del inóculo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos tres veces. La adherencia de los mutantes se da como el porcentaje con relación al tipo silvestre. Las cepas mutantes y de tipo silvestre crecieron comparativamente en medio RPMI (sin rojo fenol complementado con FCS al 1%) únicamente.

60 Estudios de virulencia *in vivo*. Se usaron ratones CD-1 hembra no consanguíneos de ocho semanas de edad (Charles River Laboratories) para todos los modelos de infección. Se descongelaron rápidamente las alícuotas de las bacterias almacenadas a -80°C, se recogieron por centrifugación, y se resuspendieron en PBS estéril para obtener la cantidad necesaria de UFC/ml. Antes de la infección, se pasaron las cepas en ratones para mantener la virulencia tal como se describió anteriormente (Hendriksen WT y colaboradores, 2007, J. Bacteriol. 189: 1382-1389). Para el modelo de neumonía, se anestesiaron ligeramente los ratones con isoflurano al 2,5% (vol / vol)/O₂, y se infectaron por vía intranasal pipeteando 50 µl de inóculo (5x10⁶ de UFC totales) en las fosas nasales de los ratones mantenidos por posición vertical. En momentos predeterminados después de la infección, se sacrificaron grupos de

5 ratones mediante inyección con anestesia, y se recogieron muestras de sangre mediante sangrado retro-orbital. Se recuperaron las bacterias de la nasofaringe mediante lavado de las fosas nasales con 2 ml de PBS estéril (lavado nasofaríngeo, NPL). Se realizó un lavado pulmonar broncoalveolar (BAL) mediante el lavado de los pulmones con 2 ml de PBS estéril, después de lo cual se retiraron los pulmones del cuerpo y se homogeneizaron en 2 ml de PBS
 10 estéril usando un homogeneizador de mano. En el modelo de colonización, se infectaron los ratones por vía intranasal con 10 μ l de inóculo (5×10^6 de UFC totales), un volumen lo suficientemente pequeño sólo para infectar la nariz (nasofaringe) de los ratones. En instantes de tiempo predeterminados después de la infección, se recogieron NPL y de pulmón como se describió anteriormente. En el modelo de bacteriemia, se infectaron los ratones en una vena de la cola con un inóculo de 100 μ l (10^6 - 10^7 de UFC totales). Se recuperaron las bacterias de la sangre
 15 mediante una punción de la vena lateral de la cola del mismo ratón a las 0, 12, 24 y 36 horas después de la infección. El número de bacterias viables en NPL, BAL, sangre y pulmones homogeneizados se determinó mediante siembra en placas de diluciones seriadas 10 veces sobre placas de agar sangre (BA).

20 Para todos los experimentos de coinfección, se utilizó una relación 1:1 de tipo salvaje y mutante para infectar a los ratones como se describe en los modelos antes mencionados. Esta configuración reduce la variación entre los ratones individuales, la preparación y distribución de la inoculación, y la recolección de muestras. Se cuantificaron las bacterias viables mediante siembra en placa de diluciones seriadas en placas BA y placas BA complementadas ya sea con espectinomicina o espectinomicina y trimetoprima. Posteriormente, se calcularon los puntajes del índice de competición (IC) para cada animal individual tal como la relación de salida del mutante con respecto al tipo silvestre dividido por la relación de entrada del mutante con respecto a las bacterias de tipo silvestre. Para todos los experimentos en los que no se recuperaron bacterias mutantes de un ratón particular, el número 20 (límite inferior de detección) fue sustituido como el numerador. Una puntuación de los de IC de 0 indica un número igual de bacterias mutantes y de tipo silvestre, una puntuación de IC <0 indica que el mutante fue sobrepasado por la de tipo silvestre. Todos los experimentos con animales se realizaron con la aprobación del Comité del Centro Médico de Ética Animal de la Universidad Radboud de Nijmegen.
 25

30 Estudio de vacunación. Los ratones hembra CD-1 (6 semanas de edad) se inmunizaron subcutáneamente con 150 μ l de vacuna o de control (se utilizó alumbre como control negativo y Prevenar como control positivo). Gel de hidróxido de aluminio (Sigma) fue el adyuvante usado y se formuló con cada una de las vacunas a razón de 3 mg/ml. Las inmunizaciones completas consistieron en tres dosis a intervalos de 14 días. Cada grupo consistió en 10 ratones. Los ratones vacunados en forma individual recibieron 50 μ g de antígeno y los ratones que recibieron una combinación de ambas proteínas DHH recibieron 25 μ g de cada una. Los ratones fueron expuestos a la cepa TIGR4WT dos semanas y media después de la última inmunización en nuestro modelo de neumonía y se tomaron muestras 48 horas después de la infección.
 35

40 Detección de IgG específica del antígeno por ELISA. Para determinar el concentraciones de anticuerpos contra SP1298, SP2205, SP1298/SP2205, se utilizó un procedimiento de ELISA. Se recubrieron placas de microtitulación con alta capacidad de enlazamiento (Greiner, Alphen aan de Rijn, Países Bajos) con 1 μ g/ μ l de rHisSP1298 o rHisSP2205 purificado en 100 μ l/ pozo durante la noche a 4°C. Se lavaron las placas con PBS (pH 7,4) con Tween 20 al 0,05%, a continuación se incubaron 1 h con BSA al 2% en PBS/Tween. Se añadieron diluciones de tres veces de sueros a las placas y se incubaron durante 1 h a 37°C. Después del lavado, se incubó el anticuerpo secundario de fosfatasa alcalina dirigido a IgG-Fc de ratón (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37°C usando una dilución 1:25.000. Después de lavar con Tween 20 al 0,05%, se añadieron 100 μ l/ pozo de p-nitrofenil fosfato en regulador de sustrato (dietanolamina 10 mM y cloruro de magnesio 0,5 mM, pH 9,5) y se leyó a 405 nm.
 45

50 Análisis estadístico. Las comparaciones de las cargas bacterianas entre cepas bacterianas de tipo silvestre y mutantes se realizaron mediante la prueba t de Student (desapareada) para la adherencia *in vitro* y con los modelos individuales de infección de ratón. Para la coinfección, se realizó la comparación de las puntuaciones del log de IC utilizando la prueba t de una muestra (con una mediana arbitraria de 0) considerando P <0,05 como estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 4.0.

Resultados

55 A partir de la Fig. 2 parece que la adherencia a las células epiteliales de la faringe se vio afectada en los mutantes SP1298 y SP2205 en comparación con sus respectivos tipos silvestres (ya sea TIGR4, D39 o SME215). La supresión de SP2205 mostró el efecto más dramático en los tres ambientes, siendo todos muy significativos. El mutante SP1298 mostró una disminución significativa en la adhesión en el ambiente de SME215, y una tendencia a la disminución en las otras dos cepas.

60 Con respecto a los estudios de infección, en el modelo de colonización, se observó una reducción significativa de la carga bacteriana tanto en la configuración individual como de coinfección tanto para los mutantes individuales como los mutantes dobles (Fig. 3), especialmente en el ambiente de TIGR4. No se observó un efecto sinérgico o aditivo cuando se comparan los mutantes individuales con el mutante doble, excepto para el ambiente de D39, donde el mutante doble era sobrepasado más considerablemente que los dos mutantes individuales. En el modelo de neumonía (véase la Fig. 4) todos los mutantes fueron significativamente atenuados en los pulmones en las tres cepas, tanto individualmente como en competencia con sus respectivos tipos silvestres. En el modelo de infección
 65

de bacteriemia (Fig. 5) el mutante SP2205 en TIGR4 y D39 fue atenuado únicamente en sangre en una configuración de coinfección, lo que sugiere que este mutante sólo es capaz de sobrevivir eficientemente durante la bacteriemia cuando no está en competencia con el tipo silvestre. El mutante SP1298 fue significativamente atenuado en sangre de TIGR4 y D39 tanto durante infección individual como durante coinfección.

En el estudio de vacunación, los ratones fueron inyectados con una o ambas proteínas recombinantes. Como es evidente a partir de la Fig. 5, solamente una combinación de ambas proteínas proporcionó protección contra la exposición subsiguiente con una cepa TIGR4 de *S. pneumoniae*, ya que las cargas bacterianas fueron significativamente menores en los pulmones y la sangre de estos ratones en comparación con el grupo de control negativo que recibió adyuvante (alumbre) solamente. En comparación con el control positivo (la vacuna comercialmente disponible Prevenar^{MR}) la combinación se comporta casi tan bien, mientras que los resultados individuales de las dos proteínas fueron menos pronunciados o estaban ausentes.

Se afirma por lo tanto que la combinación de SP2205 y SP1298 es una composición de vacuna prometedora, que confiere una protección significativa contra la neumonía neumocócica, indicando también que tanto SP1298 como SP2205 podrían ser considerados como potenciales candidatos para una vacuna de proteína de múltiples componentes.

Referencias

- 1 Caputo, G. M., M. Singer, S. White, y M. R. Weitekamp. 1993. Infections due to antibiotic-resistant gram-positive cocci. *J. Gen. Intern. Med.* 8: 626-634.
- 2 Faden, H., L. Duffy, R. Wasielewski, J. Wolf, D. Krystofik, y Y. Tung. 1997. Relationship between nasopharyngeal colonisation and the development of otitis media in children; Tonawanda/Williamsville Pediatrics. *J Infect Dis.* 175: 1440-1445.
- 3 Homoe, P., J. Prag, S. Farholt, J. Henrichsen, A. Hornsleth, M. Kilian, y J. S. Jensen. 1996. High rate of nasopharyngeal carriage of potential pathogens among children in Greenland: results of a clinical survey of middle-ear disease. *Clin Infect Dis.* 23: 1081-1090.
- 4 Zenni, M. K., S. H. Cheatham, J. M. Thompson, G. W. Reed, A. B. Batson, P. S. Palmer, K. L. Holland, y K. M. Edwards. 1995. *S. pneumoniae* colonisation in the young child: association with otitis media and resistance to penicillin. *J Pediatr.* 127: 533-537.
- 5 Alonso Develasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H. *S. pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* 1995; 59: 591-603.
- 6 Mitchell TJ, Alexander JE, Morgan PJ, Andrew PW. Molecular analysis of virulence factors of *S. pneumoniae*. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 1997; 26: 62S-71S.
- 7 Butler JC. Epidemiology of pneumococcal serotypes and conjugate vaccine formulations. *Microb. Drug Resist.* 1997; 3: 125-129.
- 8 Dagan R, Melamed R, Muallem M, Piglansky L, Yagupsky P. Nasopharyngeal colonisation in Southern Israel with antibiotic-resistant pneumococci during the first 2 years of life: relation to serotypes likely to be included in pneumococcal conjugate vaccines. *J. Infect. Dis.* 1996; 174: 1352-1355.
- 9 Barnes DM, Whittier S, Gilligan PH, Soares S, Tomasz A, Henderson FW. Transmission of multidrug-resistant serotype 23F *S. pneumoniae* in group day care: evidence suggesting capsular transformation of the resistant strain in vivo. *J. Infect. Dis.* 1995; 171: 890-896.
- 10 Hermans PW, Sluijter M, Dejsirilert S, y colaboradores. Molecular epidemiology of drug-resistant pneumococci: toward an international approach. *Microb. Drug Resist.* 1997; 3: 243-51.
- 11 Hermans PW, Sluijter M, Elzenaar K, et al. Penicillin-resistant *S. pneumoniae* in the Netherlands: results of a 1-year molecular epidemiologic survey. *J. Infect. Dis.* 1997; 175: 1413-22.
- 12 Paton JC, Lock RA, Hansman DJ. Effect of immunisation with pneumolysin on survival time of mice challenged with *S. pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1983; 40: 548-52.
- 13 McDaniel LS, Sheffield JS, Delucchi P, Briles DE. PspA, a surface protein of *S. pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect. Immun.* 1991; 59: 222-8.
- 14 Talkington DF, Crimmins DL, Voellinger DC, Yother J, Briles DE. A 43-kilodalton pneumococcal surface protein, PspA: isolation, protective abilities, and structural analysis of the amino-terminal sequence. *Infect. Immun.* 1991; 59: 1285-9.
- 15 Wu MHN, Y. Guo, Michael W. Russel, y David E. Briles. Intranasal immunisation of mice with pspA (pneumococcal surface protein A) can prevent intranasal carriage, pulmonary infection, and sepsis with *S. pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 1997; 175: 839-846.
- 16 Talkington DF, Brown BG, Tharpe JA, Koenig A, Russell H. Protection of mice against fatal pneumococcal challenge by immunisation with pneumococcal surface adhesin A (PsaA). *Microb. Pathog.* 1996; 21: 17-22.
- 17 Lock RA, Paton JC, Hansman D. Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *S. pneumoniae*. *Microb. Pathog.* 1988; 5: 461-7.14.

Reivindicaciones

- 5 1. Una composición inmunógena o composición de vacuna que comprende; proteína SP1298 de *S. pneumoniae* y/o un fragmento(s) inmunogénico(s) de la misma y/o proteína(s) que tiene(n) una identidad de más del 70% y proteína SP2205 de *S. pneumoniae* y/o un fragmento(s) inmunogénico(s) de la(s) misma(s) y/o una proteína(s) que tiene(n) una identidad de más del 70% para uso en medicina.
- 10 2. Una composición inmunogénica o composición de vacuna para uso de acuerdo con la reivindicación 1 para el tratamiento de infecciones microbianas.
- 15 3. Una composición de vacuna para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende adicionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 4. Una composición de vacuna para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3, que comprende adicionalmente un adyuvante.
- 25 5. Una composición de vacuna para uso de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha formulación proporciona protección contra neumonía, meningitis, otitis media y/o sepsis causada por *Streptococcus pneumoniae*.
- 30 6. Una composición inmunogénica o composición de vacuna para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende una proteína que tiene una identidad de más del 80% con la proteína SP1298 de *S. pneumoniae*, preferiblemente más del 90%.
- 35 7. Una composición inmunogénica o composición de vacuna para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende una proteína que tiene una identidad de más del 80% con la proteína SP2205 de *S. pneumoniae*, preferiblemente más del 90%.
- 40 8. Un método para la preparación de una formulación de vacuna neumocócica, en donde dicho método comprende poner en asociación, una cantidad efectiva de proteína SP1298 de *S. pneumoniae* y/o un fragmento(s) inmunogénico(s) de la misma y/o una proteína(s) que tiene(n) una identidad de más del 70% y la proteína SP2205 de *S. pneumoniae* y/o un fragmento(s) inmunogénico(s) de la misma y/o una proteína(s) que tiene(n) una identidad de más del 70% y al menos uno de un diluyente, vehículo, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable para la(s) misma(s).
- 45 9. Uso de una combinación de proteína SP1298 de *S. pneumoniae* y/o un fragmento(s) inmunogénico(s) de la misma y/o una proteína(s) que tiene(n) una identidad de más del 70% y proteína SP2205 de *S. pneumoniae* y/o un fragmento(s) inmunogénico(s) de la misma y/o una proteína(s) que tiene(n) una identidad de más del 70% para la preparación de una vacuna para el tratamiento o profilaxis de una infección por *S. pneumoniae*.
- 50 10. Uso de una combinación de proteína SP1298 de *S. pneumoniae* y/o un fragmento inmunogénico de la misma y/o una proteína(s) que tiene(n) una identidad de más del 70% y proteína SP2205 de *S. pneumoniae* y/o un fragmento(s) inmunogénico(s) de la misma y/o una proteína(s) que tiene(n) una identidad de más del 70% para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con infecciones por *S. pneumoniae*.
11. Uso de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde la combinación comprende una proteína que tiene una identidad de más del 80% con la proteína SP1298 de *S. pneumoniae*, preferiblemente más del 90%.
12. Uso de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde la combinación comprende una proteína que tiene una identidad de más del 80% con la proteína SP2205 de *S. pneumoniae*, preferiblemente más del 90%.

Fig. 1

SP1298

1 MEICQQILEK IKEYDTIIH RHMKPPDAL GSQVGLKALL EHHFPEKTIK 50
 51 AVGFDEPTLT WMAEMDLVED RAYQGALVIV CDTANTARID DKRYSQGDFL 100
 101 IKIDDHHPNDD VYGDLSWVDI SSSSASEMIT LFAQTTQLAL ADRDAELLFA 150
 151 GIVGDTGRFL YPSTTARTLR LAAYLREHNF DFAALTRKMD TMSYKIAKLQ 200
 201 GYIYDHLEVD ENGAARVILS QKILKQYNIT DAETAAIVGA PGRIDRVSLW 250
 251 GIFVEQADGH YRVRLRSKVH PINEIAKEHD GGG#PLASGA NSYSLEENEI 300
 301 IYQKLKLLK N

SP2205

1 mkkfyvspif pilvgliafg vlstfiifvn nlltvlilf lfvgyvflf 50
 51 KKLRVHYIRS DVEQIQYVNH QAEESLTALL EQMPVGMKL NLSSGEVEWF 100
 101 NPYAELILTK EDGDFDLEAV QTIKASVGN PSTYAKLGEK RYAVHMDASS 150
 151 GVLYFVDVSR EQAITDELVT SRPVIGIVSV DNYDDLEDET SESDISQINS 200
 201 FVANFISEFS EKHMFSRRV SMDRFYLFID YTVLEGLMND KFSVIDAFRE 250
 251 ESKQRQLPLT LSMGFSYGDG NHDEIGKVAL LNLNLAEVRG GDQVVVKEND 300
 301 ETKNPVYFGG GSAASIKRTR TRTRAMMTAI SDKIRSVDQV FVVGHKNLDM 350
 351 DALGSAVGMQ LFASNVIENS YALYDEEQMS PDIERAVSFI EKEGVTKLLS 400
 401 VKDAMGMVIN RSLILVDHS KTALILSKEF YDLFTQTIVI DHHRDQDFP 450
 451 DNAVITYIES GASSASELVT ELIQFQNSKK NRLSRMQASV LMAGMMLDTK 500
 501 NFTSRVISRT FDVASYLRIR GSDSIAIQEI AATDFEERYE VNELILQGRK 550
 551 LGSDVLIAEA KDMKCYDTVV ISKAADAMLA MSGIEASFVL AKNTQGFISI 600
 601 SARSRKLVN QRIMEELGGG G#FNLAAAI KDVTLSSEAGE KLTEIVLNEM 650
 651 KEKEKEE

Fig. 2

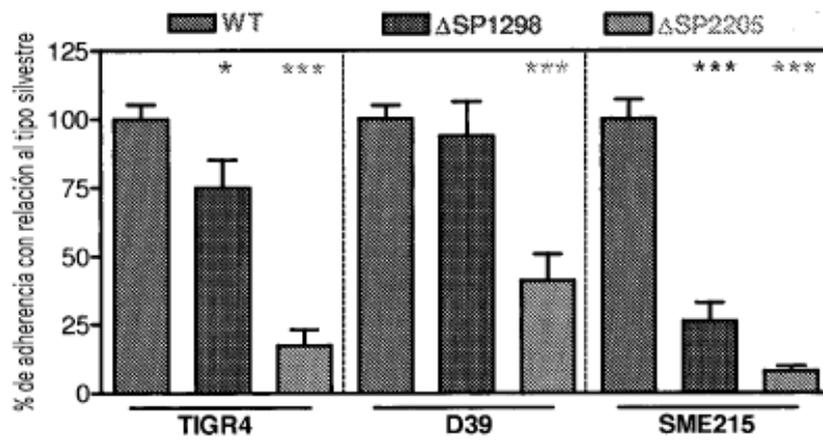


Fig. 3

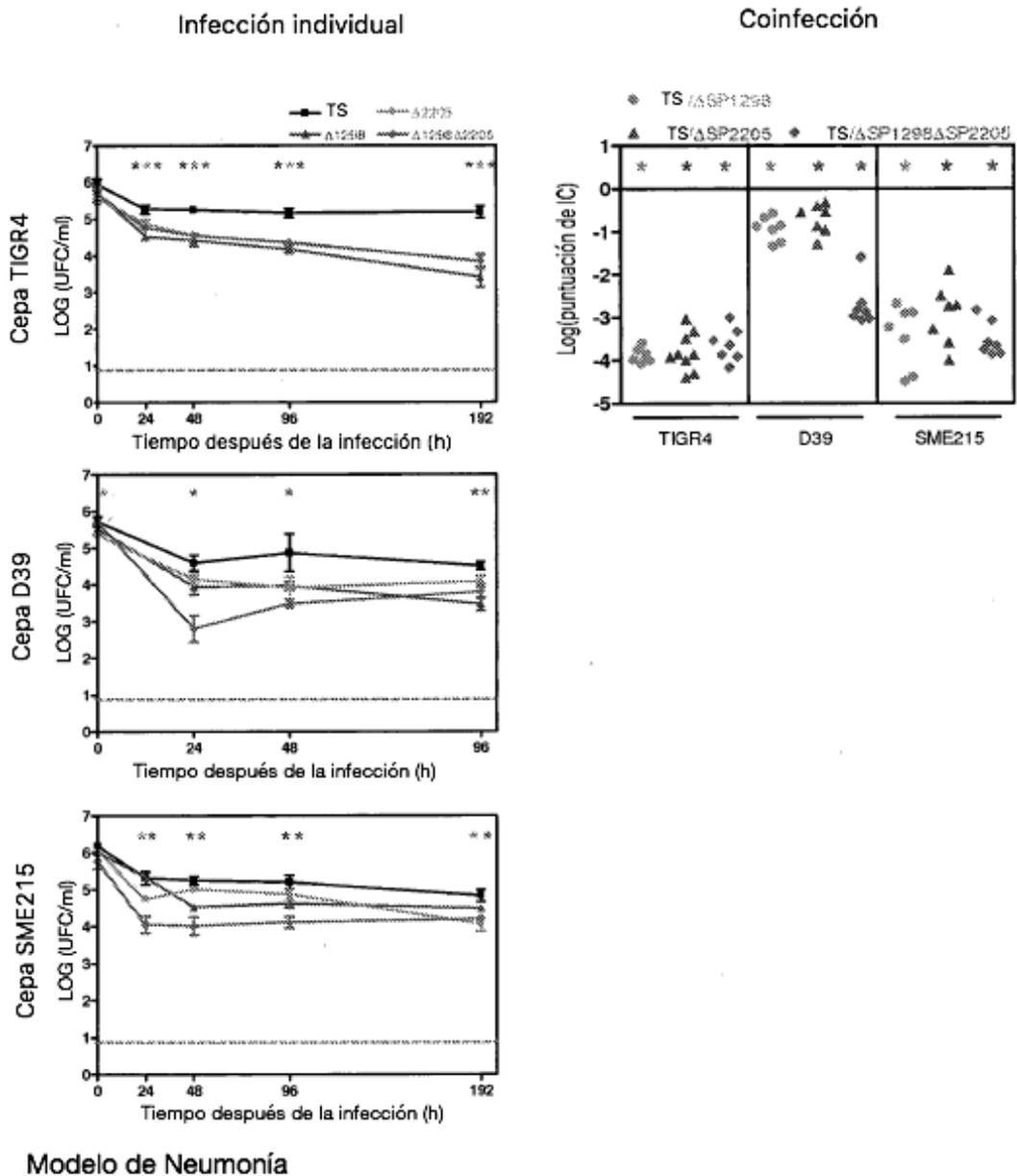


Fig. 4

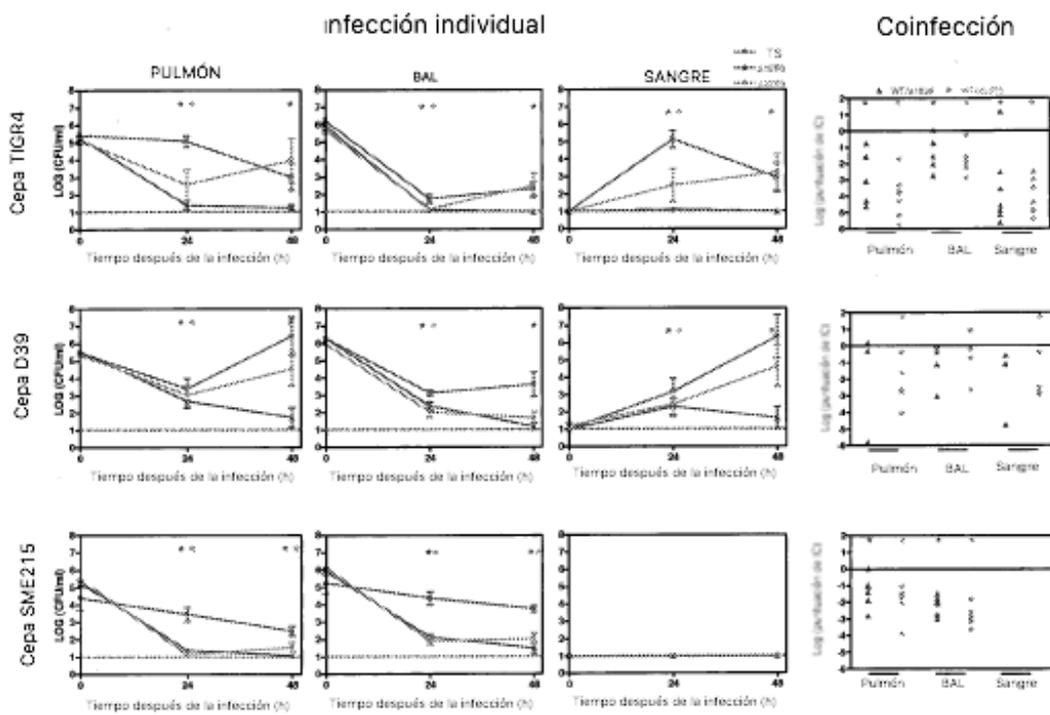


Fig. 5

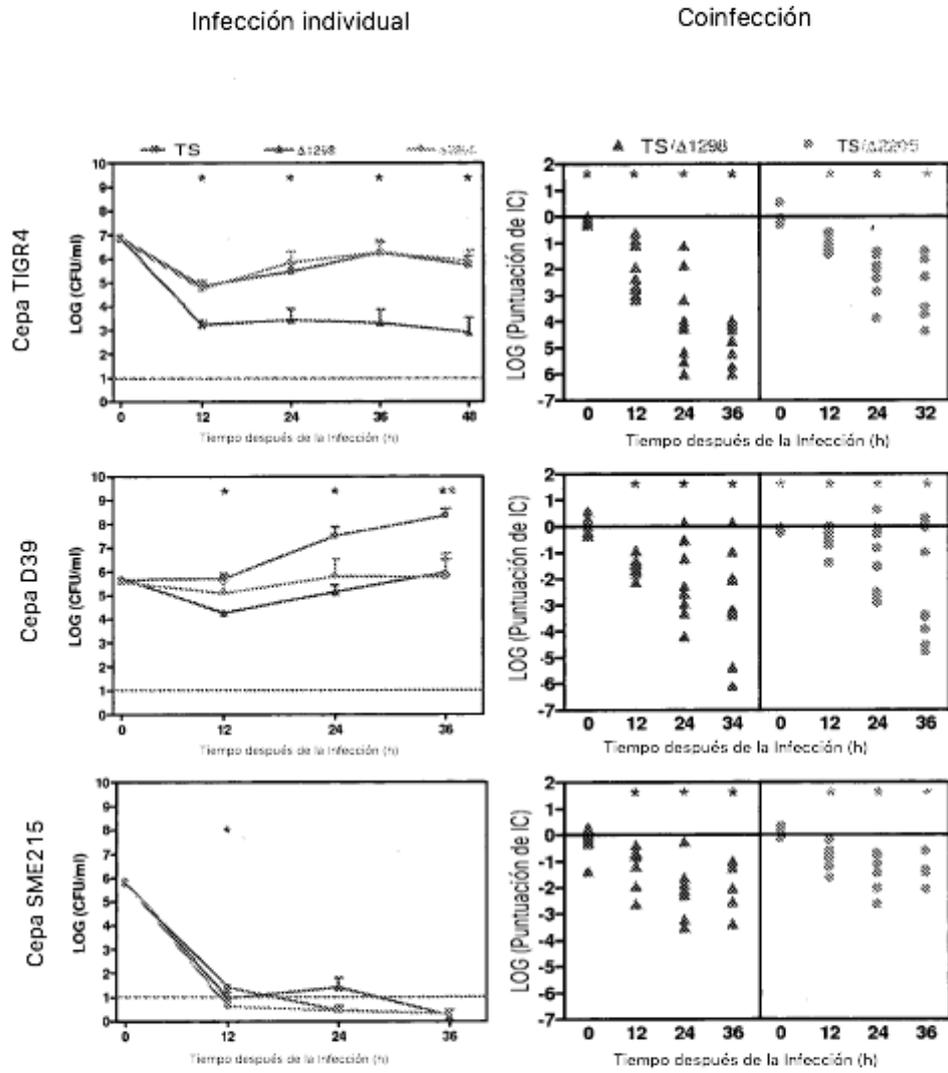


Fig. 6

