

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 979**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2011 E 11706840 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2544711**

54 Título: **Tratamiento de infecciones estreptocócicas**

30 Prioridad:

09.03.2010 GB 201003920

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

09.03.2016

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**DENOEL, PHILIPPE;
HERMAND, PHILIPPE VINCENT;
LABBE, STEVE;
POOLMAN, JAN y
RIOUX, STEPHANE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 562 979 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

Tratamiento de infecciones estreptocócicas

La presente solicitud se refiere al campo de las vacunas y de las composiciones inmunogénicas que protegen contra la enfermedad por estreptococos y en particular a vacunas que contienen proteínas provenientes de la familia de proteínas de la triada de polihistidina.

Antecedentes

Streptococcus pneumoniae es una de las causas principales de morbilidad y de mortalidad infecciosa en el mundo, responsable de un espectro grande de infecciones tales como otitis media, neumonía, bacteremia y meningitis {Hausdorff 2005, McCullers 2001}. La aparición de cepas resistentes a antibiótico de este microorganismo también ha resaltado la necesidad de proporcionar vacunación profiláctica efectiva {Lynch, III 2005, Bridy-Pappas 2005}.

Las vacunas actuales están constituidas por selecciones epidemiológicamente dominantes a base de serotipo de polisacáridos capsulares neumocócicos, conjugados o no a una proteína portadora {Dagan 2004, Fedson 2004, Mbelle 1999, Smart 1987}. Sin embargo, las formulaciones de vacuna no cubren todos los serotipos de este microorganismo, lo cual podría en particular ser de relevancia en ciertas regiones del globo con serotipos dominantes diferentes {Dagan 1992}. Además, se podría esperar que el uso de vacunas específicas de serotipo pudiera permitir, al final, la selección positiva de serotipos de tipo que no son de vacuna {Nunes 2008, Singleton 2007}.

Una estrategia alternativa implica el desarrollo de vacunas dirigidas contra antígenos neumocócicos comunes. Entre los candidatos múltiples, la familia de la proteína Pht, restringida al género *Streptococcus*, comprende algunos prometedores, que están bien conservados a través de las especies neumocócicas {Hamel 2004, Zhang 2001}, y que son objetivos para anticuerpos en los individuos infectados y son protectores después de la exposición en ratones inmunizados {Beghetto 2006}. Originalmente, tres grupos reportaron esta familia de proteínas de manera independiente, y se utilizaron tres denominaciones separadas: Pht (por *pneumococcal histidine triad*: triada de histidina neumocócica) {Adamou 2001}, Php (por *pneumococcal histidine protein*: proteína de histidina neumocócica) {Zhang 2001}, y BVH {Hamel 2004}. Dichas proteínas se caracterizan por un motivo de triada de histidina, HxxHxH, repetido cinco a seis veces en sus secuencias de aminoácidos. Se han descrito cuatro miembros de esta familia: PhtA (BVH-11-3), PhtB (PhpA/BVH-11) y PhtD (BVH-11-2) que comparten hasta el 81 % de identidad de secuencia, y PhtE (BVH-3) que diverge de las otras tres proteínas, mostrando solamente hasta el 35 % de identidad con las mismas. Es una proteína más larga, la única con seis repeticiones del motivo de triada de histidina. En estudios de inmunización en ratones, todos los miembros de la familia Pht han demostrado obtener un nivel alto de protección contra la infección neumocócica posterior con diversos cepas/serotipos diferentes {Adamou 2001, Hamel 2004, Ogunniyi 2007, Wizemann 2001, Zhang 2001}. La administración de las proteínas Pht A, B, D y/o E para tratar y prevenir enfermedades que provoca *S. pneumoniae* se describe en los documentos WO00/37105A2, WO00/39299A2, WO2009/12588A1, WO01/14421A1, WO01/98334A2, WO03/054007, y WO02/22168A2.

A pesar de su importancia potencial en la vacunación contra *S. pneumoniae*, todavía no se ha determinado la función biológica de estas proteínas. Los resultados provenientes de experimentos de marcación con anticuerpo y de citometría de flujo demostraron que las proteínas Pht están expuestas sobre la superficie de la bacteria encapsulada {Hamel 2004}, lo cual está de acuerdo con su relevancia como objetivo de vacuna. Mediante mutagénesis insercional, se ha sugerido que PhtA, PhtB, y PhtD están implicadas en la virulencia específica de pulmón {Hava 2002}, sin indicación adicional acerca de su función biológica. Entre sus supuestos papeles, se ha sugerido la neutralización del factor C3b del complemento {Hostetter 1999, Ogunniyi 2009}, lo cual implica que éstas podrían interferir con la fagocitosis. Además de esto, también se sospecha un papel en la adherencia. En efecto, se ha reportado {Panina 2003} un vínculo genético entre *phtD* e *lmb*, codificando este último una proteína supuesta de adhesión a laminina {Spellerberg 1999}. Al menos debido al alto número de restos de histidina en las triadas de histidina, se ha sugerido que las proteínas Pht pueden estar implicadas en la unión al ADN y /o metal {Adamou 2001}. De manera más específica, algunos estudios resaltan un vínculo entre la familia Pht y cinc. En efecto, se han encontrado sitios de unión a AdcR en las regiones corriente arriba de los genes *pht*, siendo AdcR descrito como un factor de transcripción que regula la captación de cinc {Panina 2003}. Asimismo, la estructura cristalina de una porción de PhtA revela la presencia de iones de cinc unidos a un dominio de triada de histidina {Riboldi-Tunnicliffe 2005}. Sin embargo, no está claro si la función de dichas proteínas es la depuración o el transporte de cinc, o si el cinc juega más bien un papel conformacional o funcional.

Los aspectos importantes que necesitan ser resueltos para los candidatos para vacuna son su nivel de expresión y regulación asociada, su presencia, así como su variabilidad de secuencia. Por lo tanto, los inventores han solucionado estos diferentes aspectos con respecto a las proteínas Pht.

Streptococcus pneumoniae provoca diferentes estados patológicos que exhiben diferentes patologías dependiendo del sitio en el cual se expande la población neumocócica. La septicemia se produce en casos en los que *S. pneumoniae* entra al torrente sanguíneo, mientras que la neumonía se presenta en casos en los que *S. pneumoniae* se multiplica en el pulmón. *S. pneumoniae* también es un patógeno importante en infecciones de otitis media. *S.*

pneumoniae también puede entrar al líquido cefalorraquídeo para ocasionar meningitis.

Existe la necesidad de desarrollar mejores vacunas neumocócicas que puedan dirigirse contra enfermedades neumocócicas específicas y que proporcionen protección óptima contra una forma particular de enfermedad neumocócica.

- 5 Por consiguiente, se proporciona una composición inmunogénica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína PthX aislada para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por *Streptococcus pneumoniae*, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en la sangre, pulmón, un compartimiento del oído o en las meninges de un paciente humano, en un entorno en el cual la concentración de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} es lo suficientemente baja como para regular de forma positiva la expresión de al menos una proteína PhtX en el *Streptococcus pneumoniae* y en la que el paciente humano tiene niveles disminuidos de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} , según se mide mediante lavado bronquial y/o análisis de sangre.

- 15 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína PhtX aislada en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección por *Streptococcus pneumoniae*, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en la sangre, pulmón, un compartimiento del oído o en las meninges de un paciente humano, en un entorno en el cual la concentración de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} es lo suficientemente baja como para regular de forma positiva la expresión de al menos una proteína PhtX en el *Streptococcus pneumoniae* y en la que el paciente humano tiene niveles disminuidos de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} , según se mide mediante lavado bronquial y/o análisis de sangre.

Leyendas de las figuras

- 20 **Figura 1.** Organización de los genes *pht* en la cepa TIGR4 serotipo 4 de *Streptococcus pneumoniae*.

- Figura 2.** Regiones corriente arriba de los genes *pht* que contienen al promotor. (a) gen *phtE*, (b) gen *phtA*, (c) gen *phtB*, (d) gen *lmb*, (e) gen *yfnA*. Las regiones -35 y -10 están con doble subrayado, los sitios de inicio de la transcripción están indicados mediante una letra en negrita y el símbolo (+1), los sitios de unión a ribosoma (rbs) supuestos están subrayados, y los marcos de lectura abiertos están representados mediante flechas que indican la dirección de transcripción a través de una serie de letras en negrita. Los números a la izquierda corresponden a las posiciones de secuencia en los números de referencia de GenBank AY569979 (a, d y e) y AY569980 (b y c).

- Figura 3.** Secuencias terminadoras de la transcripción independientes de Rho de los genes *pht* y *ptsI*. Genes (a) *phtE*, (b) *phtB*, (c) *pgtD*, (d) *phtA* y (e) *ptsI*. Los codones de detención están subrayados en negrita, las regiones terminadoras están subrayadas, y las secuencias subrayadas con una línea discontinua indican la región de horquilla de los terminadores. Los marcos de lectura abiertos están representados por flechas que indican la dirección de la transcripción a través de una serie de letras en negrita. En (a), la región en cursiva (gen *phtF*; codón de inicio supuesto con doble subrayado) presenta el 78 % de identidad con las primeras 481 pares de bases del gen *phtE*. Sin embargo, los codones de detención subrayados evitan la traducción de gen significativa. Los números corresponden a posiciones de secuencia en los números de referencia Gen Bank AY569979 (a y c) y AY569980 (b, d y e).

- Figura 4.** Análisis de RT-PCR de los transcritos de *pht*. (a) es gel de agarosa al 1 % que muestra los productos de RT-PCR con ARN de molde proveniente de células cultivadas hasta la fase de crecimiento semilogarítmica. Los carriles 1 a 8 corresponden a las regiones 1 a 8 en la representación esquemática en la (b). Los productos de RT-PCR mostrados en los carriles 1 a 8 se generan utilizando pares de cebadores que flanquean las regiones correspondientes representadas en el esquema. La longitud de cada producto de RT-PCR pronosticado se indica entre paréntesis.

- Figura 5.** Análisis de inmunotransferencia en SDS-PAGE de extractos bacterianos. Se utilizó anticuerpo anti-PhtD para sondear los extractos provenientes del mutante cuádruple PhtABDE⁻ (A), el mutante PhtE⁻ (B), mutante PhtD⁻ (C), mutante PhtB⁻ (D), mutante PhtA⁻ (E), y las cepas de tipo silvestre (F). La posición de las diferentes bandas de Pht se indica a la derecha, y el marcador de masa molecular está en el lado izquierdo de la imagen.

- Figura 6.** Curvas de crecimiento de la cepa de tipo silvestre 4/CDC y de mutantes deficientes en Pht en medio MS (a). Las curvas de crecimiento del tipo silvestre, del mutante deficiente en PhtD y del mutante cuádruple de Pht también se determinaron en MS con o sin Zn^{2+} 200 μ M (b), 200 μ M de Mn^{2+} (c), o Fe^{2+} 200 μ M (d). Cada figura representa los resultados de un experimento representativo de tres.

- Figura 7.** Se cultivaron células bacterianas WU2 con o sin TPEN 30 μ M, un agente quelante de cinc. Después, las células se sondearon con anticuerpos anti-PhtB/D (a), anti-PhtE (b), anti-PhtD/E (c), o anti-polisacárido tipo 3 (d) seguido por anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con AlexaFluor, antes de que éstos se analizaran mediante citometría de flujo. Como controles, las células se incubaron con el anticuerpo conjugado secundario. Se muestran las gráficas representativas de FACS de las diferentes condiciones.

- Figura 8.** Análisis por transferencia Western. Se sometieron extractos de células enteras a SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia. Se sondearon nueve cepas diferentes con un anti-PhtD policlonal (a), y 8 con un anti-PhtE policlonal (b). Se muestra el marcador de masa molecular.

Figura 9. Comparación de secuencias señal de miembros de la familia PhtX. Las áreas sombreadas identifican aminoácidos que están conservados en al menos 2/3 de los miembros de la familia de PhtX.

Figura 10. Supervivencia de ratones después de la exposición letal intranasal con *S. pneumoniae*. Se inmunizaron ratones (n=20/grupo) con PhtD, PhtA, PhtB, PhtE con adyuvante AS02 o con AS02 solo (control), antes que estos se expusiesen a la cepa neumocócica tipo 3/43. Se efectuaron análisis estadísticos con la prueba logrank, comparados con el control: PhtD, p=0,0126; PhtA, p=0,0103; PhtB, p=0,0038; PhtE, p=0,0033.

Figura 11. Niveles de anticuerpo después de la inmunización. A.) Los ratones se inmunizaron sistémicamente con CbpA, PspA, o PhtD con adyuvante AS02. B) Los ratones se inmunizaron por vía intranasal con CbpA, PspA o PhtD con adyuvante LT. En ambos casos la sangre se tomó en el día 42, y los niveles de anticuerpos específicos se midieron mediante ELISA.

Figura 12. Supervivencia de ratones después de la exposición letal intranasal con *S. pneumoniae*. Los ratones se inmunizaron con CbpA, PspA, PhtD con adyuvante AS02 o con AS02 solo (control), antes de que éstos se expongan a las cepas neumocócicas tipo 2/D39 (A), tipo 3/43 (B), o tipo 4/CDC (C). Los análisis estadísticos se efectuaron con la prueba logrank, comparado con el control: (A) CbpA, p=0,0002, PspA, p=0,0001; PhtD, p=0,0009. (B) CbpA, p=0,885; PspA, p=0,184; PhtD, p=0,027. (C) CbpA, p=0,825; PspA, p=0,538; PhtD, p<0,0001.

Figura 13. Eficacia de la vacuna en un modelo de colonización nasofaríngea con *S. pneumoniae*. Se inmunizaron ratones Balb/c con PhtD, PhtA, PhtB, PhtE, o LT solo (control), antes que éstos se expusieran por vía intranasal a la cepa neumocócica 2/D39. Las colonias bacterianas se contaron en los lavados nasales en el día 2 y en el día 6 después de la exposición y se expresan como ufc promedio en log₁₀. Cada punto representa un ratón. Las barras horizontales de color negro son las medias geométricas. La línea discontinua indica el límite de detección (a 0,84). Los análisis estadísticos se efectuaron por día con ANOVA. Se muestran todas las diferencias significativas, comparadas con el control. *p<0,05; ns: no significativo.

Figura 14. Eficacia de la vacuna en un modelo de colonización nasofaríngea con *S. pneumoniae*. Se inmunizaron ratones Balb/c con cualquiera de CbpA, PspA, PhtD, PsaA, o LT solo (Control), antes de que éstos se expusieran por vía intranasal a la cepa neumocócica 2/D39 (A), 4/CDC (B), o 6B/CDC (C). Las colonias bacterianas se contaron en los lavados nasales en el día 2 y en el día 6 después de la exposición, y se expresan como ufc promedio en log₁₀. Cada punto representa un ratón. Las líneas discontinuas indican el límite de detección (a 0,84). Las barras horizontales de color negro son las medias geométricas. Los análisis estadísticos se efectuaron por día con ANOVA. Se muestran todas las diferencias significativas, comparadas con el control. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001, ns: no significativo.

Figura 15. Eficacia de la vacuna en un modelo de colonización de pulmón con *S. pneumoniae*. Se inmunizaron ratones CBA/J con PhtD con adyuvante AS02 o con AS02 solo (Ctrl), antes de que éstos se expusieran a la cepa neumocócica 19F/2737, moderadamente virulenta. Los pulmones se tomaron en el día 3, 4 o 5 después de la exposición, y la carga bacteriana se evaluó mediante recuento de colonias (ufc). Cada punto representa un ratón. La línea discontinua indica el límite de detección (a 2). Las barras horizontales de color negro son las medias geométricas. Los grupos se compararon con ANOVA2 a lo largo de tres días, seguido por Tuckey-HSD: p<0,0001.

Descripción detallada

La invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína PhtX aislada, para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por *Streptococcus pneumoniae* en la cual la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en la sangre, pulmón, un compartimiento del oído o en las meninges de un paciente humano, en un entorno en el cual la concentración de Zn²⁺ y/o Mn²⁺ es lo suficientemente baja como para regular de forma positiva la expresión de al menos una proteína PhtX en el *Streptococcus pneumoniae* y en la que el paciente humano tiene niveles disminuidos de Zn²⁺ y/o Mn²⁺, según se mide mediante lavado bronquial y/o análisis de sangre.

Zn²⁺ y Mn²⁺ están presentes en un cuerpo humano en formas tanto libres como unidas. Zn²⁺ o Mn²⁺ unido está unido a proteínas tales como albúmina y constituye la mayoría de estos iones. Por otro lado, una cantidad pequeña de Zn²⁺ o Mn²⁺ libre está presente en los líquidos corporales tales como sangre, linfa, líquido intersticial o líquido cefalorraquídeo. El término "unido" se refiere a iones que están estrechamente asociados con proteínas tales como la albúmina. El término "libre" se refiere a iones que no están estrechamente asociados con proteínas tales como la albúmina. Dichos iones libres están más disponibles para la captación por parte de *S. pneumoniae*. Se desvela un procedimiento para tratar o prevenir la infección por *Streptococcus pneumoniae*, en el que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en un entorno en el cual la concentración libre de Zn²⁺ y/o Mn²⁺ es lo suficientemente baja como para regular de forma positiva la expresión de al menos una proteína PhtX en el *Streptococcus pneumoniae*. En una opción el procedimiento de la divulgación proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la infección por *Streptococcus pneumoniae* en el que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en un entorno en el cual la concentración unida y/o libre de Zn²⁺ y/o Mn²⁺ es lo suficientemente baja como para regular de forma positiva la expresión de al menos una proteína PhtX en el *Streptococcus pneumoniae*.

Con la expresión "suficientemente baja como para regular de forma positiva la expresión de al menos una proteína

PhtX" para los fines de la invención, quiere decir que el nivel de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} (unido y/o libre) es:

- 5 a) más bajo que el usualmente encontrado en la posición equivalente de un cuerpo humano, de modo tal que el nivel de expresión de al menos una proteína PhtX en *S. pneumoniae* presente en ese cuerpo, es más alto que el nivel de expresión de PhtX en *S. pneumoniae* encontrado en el compartimiento equivalente del cuerpo bajo condiciones normales (es decir en un individuo con niveles promedio de Zn^{2+} o Mn^{2+}); o
- b) más bajo que el encontrado en regiones del cuerpo con disponibilidad elevada de Zn^{2+} , de modo tal que el nivel de expresión de al menos una proteína PhtX en *S. pneumoniae* presente en dicho sitio, es más alto que el nivel de expresión de PhtX en *S. pneumoniae* encontrado en la región del cuerpo de disponibilidad elevada de Zn^{2+} en el mismo individuo.

- 10 En una realización, el nivel de Zn^{2+} unido está reducido. En una realización, el nivel de Zn^{2+} libre está reducido.

La situación a) se puede lograr a través de una disminución en los niveles generales de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} mientras que la situación b) se puede lograr con el hecho que la infección por *S. pneumoniae* se produzca en un sitio que tenga niveles comparativamente bajos de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} .

- 15 Una proteína PhtX es un miembro de la familia de proteínas de tríada de histidina. La proteína PhtX opcionalmente es la proteína de longitud completa pero puede ser un fragmento de la proteína o un fragmento o proteína de fusión que comprenda al menos un fragmento, o la proteína PhtX de longitud completa. La proteína PhtX expresada en *S. pneumoniae* será una proteína de longitud completa, sin embargo la proteína PhtX administrada a un paciente humano opcionalmente es una proteína PhtX de longitud completa, un fragmento de una proteína PhtX o una proteína de fusión que comprende al menos una proteína PhtX o fragmento de la misma.

- 20 En una realización, la proteína PhtX se selecciona a partir del grupo que consiste en PhtA, PhtB, PhtD y PhtE. En una realización, la proteína PhtX es PhtD.

- 25 La presente invención se refiere a miembros de las proteínas de la familia de la tríada de polihistidina (Pht), fragmentos o proteínas de fusión de las mismas. Las proteínas PhtA, PhtB, PhtD o PhtE pueden tener una secuencia de aminoácidos que comparte el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con una secuencia desvelada en los documentos WO 00/37105 o WO 00/39299 (por ejemplo, con la secuencia de aminoácidos 1-838 o 21-838 de SEC ID N°: 4 del documento WO 00/37105 para PhtD).

- 30 La familia de Pht (tríada de polihistidina) comprende a las proteínas PhtA, PhtB, PhtD, y PhtE. La familia se caracteriza por una secuencia de lipidación, dos dominios separados por una región rica en prolina y varias triadas de histidina, implicadas posiblemente en la unión a metal o nucleósido o en actividad enzimática, (3-5) regiones de súper hélice, un extremo N-terminal conservado y un extremo C-terminal heterogéneo. Está presente en todas las cepas de neumococos analizadas. También se han encontrado proteínas homólogas en otros *Streptococcus* y en *Neisseria*. Se entiende, sin embargo, que los términos Pht A, B, D, y E se refieren a proteínas que tienen secuencias descritas en las citas anteriores o posteriores, así como variantes de origen natural (y elaboradas por el hombre) de las mismas, que tienen una homología de secuencia que es al menos el 90 % idéntica a las proteínas mencionadas.
- 35 De manera opcional, ésta es al menos el 95 % idéntica o al menos el 97 % idéntica.

- 40 Con respecto a las proteínas PhtX, PhtA se desvela en el documento WO 98/18930, y también recibe el nombre de Sp36. Como se indicó anteriormente, ésta es una proteína de la familia de la tríada de polihistidina y tiene el motivo señal tipo II de LXXC. PhtD se desvela en el documento WO 00/37105, y también recibe el nombre de Sp036D. Como se indicó anteriormente, esta también es una proteína de la familia de la tríada de polihistidina y tiene el motivo señal tipo II de LXXC. PhtB se desvela en el documento WO 00/37105, y también recibe el nombre de Sp036B. Otro miembro de la familia de PhtB es el polipéptido degradador de C3, como se desvela en el documento WO 00/17370. Esta proteína también es de la familia de la tríada de polihistidina y tiene el motivo señal tipo II de LXXC. Por ejemplo, un equivalente inmunitariamente funcional es la proteína Sp42 descrita en el documento WO 98/18930. Un truncado de PhtB (aproximadamente 79 kD) se desvela en el documento WO99/15675, el cual también se considera un miembro de la familia PhtX. PhtE se desvela en el documento WO00/30299 y recibe el nombre de BVH-3. En casos en los que en el presente documento se haga referencia a cualquier proteína Pht, se quiere decir que se pueden utilizar fragmentos inmunogénicos o fusiones de los mismos de la proteína Pht. Por ejemplo, una referencia a PhtX incluye fragmentos inmunogénicos o fusiones de los mismos provenientes de cualquier proteína Pht. Una referencia a PhtD o PhtB también es una referencia a las fusiones PhtDE o PhtBE como se encuentra, por ejemplo, en el documento WO0198334.
- 50

- 55 El uso de la invención puede implicar la administración de la proteína PhtX de longitud completa, un fragmento de la proteína PhtX o una proteína de fusión que contiene al menos 1 o 2 fragmentos de las proteínas PhtX. En caso que se utilicen fragmentos de proteínas Pht (por separado o como parte de una proteína de fusión), cada fragmento contiene opcionalmente uno o más motivos de tríada de histidina y/o regiones de súper hélice de dichos polipéptidos. Un motivo de tríada de histidina es la porción de polipéptido que tiene la secuencia HxxHxH. en la cual H es histidina y x es un aminoácido distinto de histidina. Una región de súper hélice es una región predicha por el algoritmo "Coils", Lupus, A y col. (1991) Science 252; 1162-1164. En una realización, el fragmento, o cada fragmento, incluye uno o más motivos de tríada de histidina así como al menos una región de súper hélice. En una

realización, el fragmento o cada fragmento contiene exactamente o al menos 2, 3, 4 o 5 motivos de tríada de histidina (opcionalmente, con la secuencia original de Pht entre las 2 o más triadas, o secuencia intratriada que es más del 50, 60, 70, 80, 90 o 100 % idéntica a una secuencia de Pht intratriada neumocócica natural -por ejemplo la secuencia intratriada mostrada en SEC ID N°: 4 del documento WO 00/37105 para PhtD). En una realización, el fragmento o cada fragmento contiene exactamente o al menos 2, 3 o 4 regiones de súper hélice. En una realización, una proteína Pht desvelada en el presente documento incluye a la proteína de longitud completa con la secuencia señal unida, la proteína de longitud completa madura con el péptido señal (por ejemplo 20 aminoácidos en el extremo N-terminal) eliminado, variantes de la proteína Pht de origen natural y fragmentos inmunogénicos de la proteína Pht (por ejemplo fragmentos como se describe anteriormente o polipéptidos que comprenden al menos 15, 20, 30, 40, 50, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 aminoácidos contiguos provenientes de una secuencia de aminoácidos en el documento WO00/37105 (SEC ID N°: 4, 6, 8 o 10) o en el documento WO00/39299 (SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10 o 14), en la que dicho polipéptido puede provocar una respuesta inmunitaria específica para dicha secuencia de aminoácidos en el documento WO00/37105 o en el documento WO00/39299. En una realización, la proteína PhtX es un fragmento descrito en el documento WO 09/12588, por ejemplo aquellos que comprenden o consisten de las secuencias de SEC ID N°: 2, 3 o 4.

En particular, el término "PhtD" tal como se utiliza en el presente documento, incluye la proteína de longitud completa con la secuencia señal unida, la proteína de longitud completa madura con el péptido señal (por ejemplo, 20 aminoácidos en el extremo N-terminal) eliminado, variantes de origen natural de PhtD y fragmentos inmunogénicos de PhtD (por ejemplo, fragmentos como se describe anteriormente o polipéptidos que comprenden al menos 15 o 20 aminoácidos contiguos provenientes de una secuencia de aminoácidos de PhtD en el documento WO00/37105 o en el documento WO00/39299, en el que dicho polipéptido puede provocar una respuesta inmunitaria específica para dicha secuencia de aminoácidos de PhtD en el documento WO00/37105 o en el documento WO00/39299 (por ejemplo SEC ID N°: 4 del documento WO 00/37105 o SEC ID N°: 14 del documento WO 00/39299 para PhtD). En la presente invención se pueden utilizar todas las formas de PhtD mencionadas anteriormente.

En una realización de la invención, el uso en el tratamiento o la prevención está dirigido a *S. pneumoniae*, que crece en la sangre del paciente, por ejemplo para el tratamiento o la prevención de septicemia o bacteremia. En una realización, el nivel de la concentración libre de Zn^{2+} en la sangre es menor de 10 nM, 7 nM, 5 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 700 pM, 500 pM, 300 pM, 200 pM 100 pM, 70 pM, 50 pM, 30 pM, 20 pM o 10 pM según se mide para suero sanguíneo. El nivel de Zn^{2+} se puede medir preparando una muestra de suero proveniente de una muestra de sangre utilizando procedimientos estándar y analizando la muestra utilizando espectrofotómetro de absorbancia en horno de grafito (GF-AAS) o utilizando espectroscopia de absorción atómica, por ejemplo utilizando un espectrómetro ICP-AES simultáneo Vista AX-CCD.

En una realización de la invención, la concentración unida y libre de Zn^{2+} en la sangre es menor de 5, 3, 2, 1, 0,5, 0,3, 0,2 o 0,1 mg/l o menor de 20, 18, 15, 12, 10, 8, 5, 3, 2, 1, 0,5 o 0,1 μ M tal como se mide para suero sanguíneo. El nivel de Zn^{2+} se puede medir preparando una muestra de suero proveniente de una muestra de sangre utilizando procedimientos estándar y analizando la muestra utilizando espectrofotómetro de absorbancia en horno de grafito (GF-AAS) o utilizando espectroscopia de absorción atómica, por ejemplo utilizando un espectrómetro ICP-AES simultáneo Vista AX-CCD.

En una realización de la invención, la concentración libre de Mn^{2+} en la sangre es menor de 10 nM, 7 nM, 5 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 700 pM, 500 pM, 300 pM, 200 pM 100 pM, 70 pM, 50 pM, 30 pM, 20 pM o 10 pM según se mide para suero sanguíneo. El nivel de Mn^{2+} se puede medir preparando una muestra de suero proveniente de una muestra de sangre utilizando procedimientos estándar y analizando la muestra utilizando espectroscopia de absorción atómica por ejemplo utilizando un espectrómetro ICP-AES simultáneo Vista AX-CCD.

En una realización de la invención, la concentración unida y libre de Mn^{2+} en la sangre es menor de 5, 3, 2, 1, 0,5, 0,3, 0,2 o 0,1 mg/l o menor de 20, 18, 15, 12, 10, 8, 5, 3, 2, 1, 0,5, 0,2 o 0,1 μ M según se mide para suero sanguíneo. El nivel de Mn^{2+} se puede medir preparando una muestra de suero proveniente de una muestra de sangre utilizando procedimientos estándar y analizando la muestra utilizando espectroscopia de absorción atómica por ejemplo utilizando un espectrómetro ICP-AES simultáneo Vista AX-CCD.

En una realización de la invención, el uso en el tratamiento o la prevención está dirigido a *S. pneumoniae* que crece en el pulmón del paciente, por ejemplo el tratamiento o la prevención de neumonía. En una realización, la concentración libre de Zn^{2+} en el pulmón es menor de 300, 200, 100, 80, 50, 20, 10, 5, 3 o 1 μ g/kg según se mide a partir de un lavado bronquial. En una realización, la concentración libre de Mn^{2+} en el pulmón es menor de 300, 200, 100, 80, 50, 20, 10, 5, 3 o 1 μ g/kg según se mide a partir de un lavado bronquial. De manera opcional, el nivel de Zn^{2+} o Mn^{2+} se mide a partir de una muestra de tejido en cuyo caso la concentración de Zn^{2+} (o Mn^{2+}) en el tejido pulmonar es menor de 20, 15, 10, 5, 2 o 1 μ g/g o 300, 200, 150, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 o 0,1 μ M tal como se mide a partir de tejido pulmonar. De manera similar, el nivel de iones en la muestra de tejido se puede medir mediante espectroscopia de absorción atómica por ejemplo utilizando un espectrómetro ICP-AES simultáneo Vista AX-CCD.

En una realización, la infección por *S. pneumoniae* se produce en el compartimiento del oído, por ejemplo el oído medio, por ejemplo como una infección de otitis media. En una realización, el nivel de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} en el oído medio

ES 2 562 979 T3

es menor de 300, 200, 150, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2 o 0,1 μM .

En una realización, la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en las meninges, por ejemplo como una infección de meningitis. En una realización la concentración de Zn^{2+} en el líquido cefalorraquídeo es menor de 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25 o 0,1 μM o menor de 100, 75, 50, 40, 25, o 10 $\mu\text{g/l}$. En una realización, la concentración de Mn^{2+} en el líquido cefalorraquídeo es menor de 2.5, 2, 1,5, 1 o 0,5 $\mu\text{g/l}$ o menor de 50, 25, 10 o 5 nM.

En una realización de la invención, el paciente humano tiene nivel(es) disminuido(s) de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} según se mide mediante lavado bronquial y/o análisis de sangre.

Con "nivel(es) disminuido(s)" se quiere decir que el nivel de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} según se mide mediante lavado bronquial o análisis de sangre es menor del de un humano promedio.

10 En una realización de la invención, el paciente humano a ser tratado con PhtX es deficiente en Zn^{2+} y/o Mn^{2+} . Es decir, el nivel de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} es menor del 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 o 1 % del nivel habitual para ese líquido corporal, por ejemplo, suero sanguíneo, líquido cefalorraquídeo, líquido intersticial, lavado bronquial.

En una realización, el paciente humano está estresado. El paciente estresado tiene en el cuerpo niveles más bajos de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} , por ejemplo en la sangre, líquido intersticial, líquido cefalorraquídeo y/o linfa.

15 En una realización, el paciente humano tiene en el cuerpo niveles más bajos de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} debido a infección previa con una cepa bacteriana, por ejemplo una cepa de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. difficile*, estreptococos del Grupo A, estreptococos del Grupo B y/o *M. catarrhalis*. La infección previa opcionalmente es una infección bacteriana crónica.

20 En una realización, la administración de PhtX, por ejemplo PhtD, es para el tratamiento o la prevención de infección por *Streptococcus pneumoniae* en forma de septicemia, bacteremia, meningitis, otitis media o neumonía.

La proteína PhtX también se puede combinar de forma beneficiosa con antígenos adicionales en el procedimiento o el uso de la invención. Con combinado, se quiere decir que la composición inmunogénica comprende todas las proteínas dentro de las siguientes combinaciones, ya sea como proteínas portadoras o como proteínas libres o una mezcla de las dos. Por ejemplo, en una combinación de dos proteínas como se indica en el presente documento, 25 ambas proteínas se pueden utilizar como proteínas portadoras, o ambas proteínas pueden estar presentes como proteínas libres, o ambas pueden estar presentes como proteína portadora y como proteína libre, o una puede estar presente como una proteína portadora y una proteína libre mientras que la otra está presente solamente como una proteína portadora o solamente como una proteína libre, o una puede estar presente como una proteína portadora y la otra como una proteína libre. En casos en los que se dé una combinación de tres proteínas, existen posibilidades similares. Las combinaciones incluyen pero sin limitación, PhtD + NR1xR2, PhtD + proteínas quiméricas o de fusión NR1xR2-Sp91Cterminal, PhtD + Ply, PhtD + Sp128, PhtD + PsaA, PhtD + PspA, PhtA + NR1xR2, PhtA + proteínas quiméricas o de fusión NR1xR2-Sp91Cterminal, PhtA + Ply, PhtA + Sp128, PhtA + PsaA, PhtA + PspA, R1xR2 + PhtD, R1xR2 + PhtA. De manera opcional, NR1xR2 (o R1xR2) proviene de CbpA o PspC. De manera opcional ésta 30 proviene de CbpA. Otras combinaciones incluyen combinaciones de 3 proteínas tales como PhtD + NR1xR2 + Ply, y PhtA + NR1xR2 + PhtD. En una realización, la composición de vacuna comprende neumolisina destoxificada y PhtD o PhtDE como proteínas portadoras. En una realización adicional, la composición de vacuna comprende neumolisina destoxificada y PhtD o PhtDE como proteínas libres. En una realización, la combinación de proteínas comprende PhtD y neumolisina o PhtD y neumolisina destoxificada. En una realización, el uso de la invención utiliza una combinación de PhtD, neumolisina destoxificada y al menos un sacárido capsular de *S. pneumoniae*, 40 preferentemente conjugado a una proteína portadora.

Un aspecto, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una proteína PhtX y al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 1,5, 16, 17, 18 o 20 conjugados de sacárido capsular de *S. pneumoniae* que contienen sacáridos de serotipos diferentes de *S. pneumoniae*. En tal realización, al menos un sacárido está 45 conjugado a una proteína PhtX tal como PhtD o proteína de fusión de la misma, y la composición inmunogénica puede provocar una respuesta inmunitaria eficaz contra PhtX, por ejemplo PhtD. En un aspecto adicional de la invención, la composición inmunogénica comprende al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 1,5, 16, 17, 18 o 20 conjugados de sacárido capsular de *S. pneumoniae* que contienen sacáridos de serotipos diferentes de *S. pneumoniae* y una proteína PhtX, por ejemplo PhtD como una proteína libre o no conjugada.

En una realización, la composición inmunogénica de la invención comprende neumolisina. Preferentemente, la 50 neumolisina está destoxificada, por ejemplo mediante tratamiento químico o mediante mutación de al menos un aminoácido.

La presente invención adicionalmente proporciona una composición inmunogénica que contiene un excipiente y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

55 Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden tener adyuvantes, en particular cuando se pretenden para su uso en una población de adultos de edad avanzada, pero también para su uso en poblaciones de niños menores de un año de edad. Los adyuvantes apropiados incluyen una sal de aluminio tal como gel de

hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio o alumbre, pero también pueden ser otras sales de metal tales como las de calcio, magnesio, hierro o cinc.

El adyuvante se selecciona opcionalmente para que sea un inductor preferencial de una respuesta de tipo TH1. Dichos niveles altos de citocinas tipo Th1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por célula hacia un antígeno dado, mientras que los niveles altos de citocinas tipo Th2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales hacia el antígeno.

La distinción de respuesta inmunitaria tipo Th1 y Th2 no es absoluta. En realidad un individuo soportará una respuesta inmunitaria que se describe como predominantemente Th1 o predominantemente Th2. Sin embargo, con frecuencia es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de la descrita en clones de linfocitos T CD4 +ve murinos por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. (Annual Review of Immunology, 7, p145-173)). Tradicionalmente, las respuestas tipo Th1 están asociadas con la producción de las citocinas INF- γ e IL-2 por los linfocitos T. Otras citosinas, con frecuencia asociadas directamente con la inducción de respuestas inmunitarias tipo Th1, tales como IL-12, no las producen los linfocitos T. En contraste, las respuestas tipo Th2 están asociadas con la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-0. Los sistemas de adyuvante apropiados que promueven una respuesta predominantemente Th1 incluyen: monofosforil-lípido A o un derivado del mismo (o lípido A destoxificado en general - véase por ejemplo el documento WO2005107798), en particular monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) (para su preparación véase el documento GB 2220211 A); y una combinación de monofosforil-lípido A, opcionalmente monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado, junto con cualquiera de una sal de aluminio (por ejemplo fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio) o una emulsión aceite en agua. En tales combinaciones, el antígeno y 3D-MPL están contenidos en las mismas estructuras particuladas, lo que permite un suministro más eficiente de señales antigénicas e inmunoestimuladoras. Los estudios han demostrado que 3D-MPL puede potenciar adicionalmente la inmunogenicidad de un antígeno adsorbido en alumbre [Thoelen y col. Vaccine (1998) 16:708-14; EP 689454-B1].

Un sistema potenciado implica la combinación de un monofosforil-lípido A y un derivado de saponina, en particular la combinación de QS21 y 3D-MPL como se desvela en el documento WO 94/00153, o una composición menos reactiva en la cual QS21 se extingue con colesterol como se desvela en el documento WO 96/33739. Una formulación de adyuvante particularmente potente, que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión aceite en agua, se describe en el documento WO 95/17210. En una realización, la composición inmunogénica comprende adicionalmente una saponina, la cual puede ser QS21. La formulación también puede comprender una emulsión aceite en agua y tocoferol (documento WO 95/17210). Los oligonucleótidos que contienen CpG no metilado (documento WO 96/02555) y otros oligonucleótidos inmunomoduladores (documentos WO0226757 y WO03507822) también son inductores preferenciales de una respuesta TH1, y son apropiados para su uso en la presente invención.

Se ha sugerido que los adyuvantes de emulsión aceite en agua *per se* son útiles como composiciones de adyuvante (documento EP 0 399 843B), también se han descritos como adyuvantes para vacunas combinaciones de emulsiones aceite en agua y otros agentes activos (documentos WO 95/17210; WO 98/56414; WO 99/12565; WO 99/11241). Se han descrito otros adyuvantes de emulsión de aceite, tales como emulsiones agua en aceite (documentos US 5.422.109; EP 0 480 982 B2) y emulsiones agua en aceite en agua (documentos US 5.424.067; EP 0 480 981 B). De las cuales todas forman sistemas de emulsión oleosa (en particular cuando se incorporan tocoles) para formar los adyuvantes y las composiciones de la presente invención.

En una realización, la emulsión oleosa (por ejemplo emulsiones aceite en agua) también comprenden un emulsionante tal como TWEEN 80 y/o un esteroles tal como colesterol.

En una realización, la emulsión oleosa (opcionalmente emulsión aceite en agua) comprende un aceite no tóxico, metabolizable, tal como escualano, escualeno o un tocoferol tal como alfa-tocoferol (y opcionalmente tanto escualeno como alfa-tocoferol), y opcionalmente un emulsionante (o agente tensioactivo) tal como Tween 80. También se puede incluir un esteroles (por ejemplo colesterol).

El procedimiento para producir emulsiones aceite en agua es bien conocido por el experto en la materia. Comúnmente, el procedimiento comprende mezclar la fase oleosa que contiene tocol con un agente tensioactivo tal como una solución de PBS/TWEEN80™, seguido por homogenización utilizando un homogeneizador, sería evidente para un experto en la materia que un procedimiento que comprende hacer pasar la mezcla dos veces a través de la aguja de una jeringa, sería apropiado para homogeneizar volúmenes pequeños de líquido. De igual manera, el procedimiento de emulsificación en microfluidizador (máquina M110S Microfluidics, máximo de 50 pases, durante un periodo de 2 minutos a una entrada de presión máxima de 600 kPa (presión de salida de aproximadamente 85 MPa)) podría ser adaptado por el experto en la materia para producir volúmenes más pequeños o más grandes de emulsión. La adaptación se puede lograr mediante experimentación de rutina que comprende la medición de la emulsión resultante hasta que se logre una preparación con gotas minúsculas de aceite del diámetro requerido.

En una emulsión aceite en agua, el aceite y el emulsionante deben estar en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

Opcionalmente, el tamaño de las gotitas de aceite encontradas dentro de la emulsión aceite en agua estable son menores de 1 micrómetro, sustancialmente pueden estar en el intervalo de 30-600 nm, de manera opcional sustancialmente alrededor de 30-500 nm de diámetro, y de manera opcional sustancialmente 150-500 nm de diámetro, y en particular aproximadamente 150 nm de diámetro, según se mide mediante espectroscopia de correlación de fotones. En este sentido, el 80 % de las gotitas de aceite en número debe estar dentro de los intervalos, opcionalmente más del 90 % y opcionalmente más del 95 % de las gotitas de aceite en número están dentro de los intervalos de tamaño definidos. Las cantidades de los componentes presentes en las emulsiones oleosas de la presente invención, de forma convencional están en el intervalo del 0,5-20 % o del 2 a 10 % de aceite (del volumen de dosis total), tal como escualeno; y cuando está presente, del 2 a 10 % de alfa-tocoferol; y desde el 0,3 a 3 % de agente tensioactivo, tal como monooleato de polioxietileno sorbitano. De manera opcional, la relación de aceite (por ejemplo escualeno):tocol (por ejemplo α -tocoferol) es igual o menor de 1, ya que esto proporciona una emulsión más estable. También puede estar presente un emulsionante, tal como Tween80 o Span 85, a un nivel de aproximadamente el 1 %. En algunos casos podría ser conveniente que las vacunas de la presente invención contengan también un estabilizador.

Los ejemplos de sistemas de emulsión se describen en los documentos WO 95/17210, WO 99/11241 y WO 99/12565, los cuales desvelan adyuvantes de emulsión a base de escualeno, α -tocoferol, y TWEEN 80, formulados opcionalmente con los inmunoestimulantes QS21 y/o 3D-MPL.

Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el adyuvante de la invención puede comprender adicionalmente inmunoestimulantes adicionales, tales como LPS o derivados del mismo, y/o saponinas. Los ejemplos de inmunoestimulantes adicionales se describen en el presente documento y en "Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach" 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volumen 6, Eds. Powell, M.F., y Newman, M.J., Plenum Press, Nueva York y Londres, ISBN 0-306-44867-X.

Las preparaciones de vacuna que contienen composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden utilizar para proteger o tratar un mamífero susceptible a la infección, por medio de la administración de dicha vacuna a través de la vía sistémica o en mucosas. Estas administraciones pueden incluir inyección a través de las vías de administración intramuscular (IM), intraperitoneal (IP), intradérmica (ID) o subcutánea (SC); o a través de administración en las mucosas a los tractos oral/alimentario, respiratorio, genitourinario. Es posible la administración intranasal (IN) de las vacunas para el tratamiento de neumonía u otitis media (ya que la presencia nasofaríngea de neumococos se puede evitar de manera más efectiva, atenuando de este modo la infección en su etapa más temprana). Aunque la vacuna de la invención se puede administrar como una dosis única, los componentes de la misma también se pueden coadministrar juntos al mismo tiempo o en tiempos diferentes (por ejemplo los conjugados de sacárido neumocócico se pueden administrar por separado, al mismo tiempo o 1-2 semanas después de la administración de cualquier componente de proteína bacteriana para la coordinación óptima de las respuestas inmunitarias una con respecto a la otra). Para la coadministración, el adyuvante opcional para Th1 puede estar presente en cualquiera o en todas las diferentes administraciones. Además de una vía de administración única, se pueden utilizar 2 vías de administración diferentes. Por ejemplo, los sacáridos o conjugados de sacárido se pueden administrar IM (o ID) y las proteínas bacterianas se pueden administrar IN (o ID). Además, las vacunas de la invención se pueden administrar IM para dosis de cebado e IN para dosis de refuerzo.

El contenido de antígenos de proteína en la vacuna típicamente está en el intervalo de 1-100 μ g, opcionalmente de 5-50 μ g, por ejemplo en el intervalo de 5-25 μ g. Después de una vacunación inicial, los individuos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas de forma adecuada.

La preparación de vacunas se describe en términos generales en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds Powell M.F. & Newman M.J.) (1995) Plenum Press New York). Fullerton, patente E.U.A. 4.235.877, describe la encapsulación dentro de liposomas.

Las vacunas o composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden almacenar en solución o liofilizadas. En una realización, la solución se liofiliza en presencia de un azúcar que actúa como un lioprotector amorfo, tal como sacarosa, trehalosa, glucosa, manosa, maltosa o lactosa. En una realización, la solución se liofiliza en presencia de un azúcar que actúa como un lioprotector amorfo, y de un agente formador de volumen que provea estructura mejorada de torta, tal como glicina o manitol. La presencia de un agente cristalino formador de volumen permite el acortamiento de los ciclos de congelamiento-desechado, en presencia de concentración alta de sal. Los ejemplos de dichas mezclas para su uso en la liofilización de las composiciones inmunogénicas o vacunas de la invención incluyen sacarosa/glicina, trehalosa/glicina, glucosa/glicina, manosa/glicina, maltosa/glicina, sacarosa/manitol/trehalosa/manitol, glucosa/manitol, manosa/manitol y maltosa/manitol. Típicamente, la relación molar de los dos constituyentes es, de forma opcional, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 o 1:6. Las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden de forma opcional a los reactivos de liofilización descritos anteriormente.

Los agentes estabilizadores anteriores y las mezclas de agentes estabilizadores pueden también incluir un polímero que pueda aumentar la temperatura de transición vítrea (T_v) de la formulación, tal como poli(vinilpirrolidona) (PVP), almidón hidroxietilo o dextrano, o un polímero que actúa como un agente cristalino formador de volumen tal como polietilenglicol (PEG) que tenga por ejemplo un peso molecular entre 1500 y 6000, y dextrano.

Aunque las composiciones inmunogénicas de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier vía, la administración de las vacunas descritas al interior de la piel (ID) forma una realización de la presente invención. La piel humana comprende una cutícula exterior "córnea", llamada el estrato córneo, la cual recubre la epidermis. Debajo de esta epidermis está una capa llamada la dermis, la que a su vez recubre el tejido subcutáneo. Los

5 investigadores han demostrado que la inyección de una vacuna al interior de la piel, y en particular la dermis, estimula una respuesta inmunitaria, la cual también puede asociarse con diversas ventajas adicionales. La vacunación intradérmica con las vacunas descritas en el presente documento forma una característica opcional de la presente invención.

10 La técnica convencional de inyección intradérmica, el "procedimiento mantoux", comprende las etapas de limpiar la piel, y después estirarla con una mano, y con el bisel de una aguja de calibre estrecho (calibre 26-31) orientado hacia arriba, la aguja se inserta en un ángulo de entre 10-15°. Una vez que el bisel de la aguja está insertado, se baja el barril de la aguja y se hace avanzar adicionalmente al tiempo que se proporciona una ligera presión para elevarla bajo la piel. Después el líquido se inyecta muy lentamente con lo cual se forma una vesícula o protuberancia en la superficie de la piel, seguido por retiro lento de la aguja.

15 Más recientemente, se han descrito dispositivos que están específicamente diseñados para administrar agentes líquidos al interior o a través de la piel, por ejemplo los dispositivos descritos en los documentos WO 99/34850 y EP 1092444, también los dispositivos de inyección a chorro descritos por ejemplo en los documentos WO 01/13977; E.U.A. 5.480.381, E.U.A. 5.599.302, E.U.A. 5.334.144, E.U.A. 5.993.412, E.U.A. 5.649.912, E.U.A. 5.569.189, E.U.A. 5.704.911, E.U.A. 5.383.851, E.U.A. 5.893.397, E.U.A. 5.466.220, E.U.A. 5.339.163, E.U.A. 5.312.335, E.U.A. 20 5.503.627, E.U.A. 5.064.413, E.U.A. 5.520.639, E.U.A. 4.596.556, E.U.A. 4.790.824, E.U.A. 4.941.880, E.U.A. 4.940.460, WO 97/37705 y WO 97/13537. Los procedimientos alternativos de administración intradérmica de las preparaciones de vacuna pueden incluir jeringas y agujas convencionales, o dispositivos diseñados para el suministro balístico de vacunas sólidas (documento WO 99/27961), o parches transdérmicos (documento WO 97/48440; documento WO 98/28037); o aplicados a la superficie de la piel (suministro transdérmico o transcutáneo documento WO 98/20734; documento WO 98/28037.

25 Las expresiones "que comprende", "comprenden" y "comprende" en el presente documento están pensados por los inventores para que sean opcionalmente sustituibles por las expresiones "que consiste en", "consisten de" y "consiste en", respectivamente, en cada caso.

30 Las realizaciones en el presente documento que se refieren a "composiciones de vacuna" de la invención también son aplicables a realizaciones que se refieren a "composiciones inmunogénicas" de la invención, y viceversa.

Para que la presente invención pueda entender mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos son solo para fines de ilustración, y no se deben considerar como limitantes del ámbito de la invención en modo alguno.

Ejemplos

Procedimientos

35 *Animales*

Los ratones OF1 y CBA/J hembra utilizados en este estudio se adquirieron de los laboratorios Charles River (Lyon, Francia). Los ratones Balb/c provienen de Harlan (Horst, Los Países Bajos). Todos los experimentos y ensayos se realizaron en las instalaciones de GlaxoSmithKline Biologicals (GSK, Rixensart, Bélgica) en conformidad con los lineamientos nacionales Belgas para la experimentación con animales.

40 *Cepas bacterianas y condiciones de cultivo*

JC Paton (Universidad de Adelaida, Australia) proporcionó amablemente la cepa 2/D39. Las cepas 4/CDC y 6B/CDC se obtuvieron del Centro para Control y Prevención de Enfermedades (Center for Disease Control and Prevention (CDC)), y la cepa 19F/2737 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American type culture collection (ATCC)). E Yourassowski (Hospital Brugmann, Universidad de Bruselas, Bélgica) proporcionó la cepa 3/43.

45 Andrew Camilli proporcionó amablemente la cepa TIGR4 de *S. pneumoniae* {Tettelin 2001} (Escuela de Medicina de la Universidad Tufts, Boston, MA, E.U.A.). David E Briles (Universidad de Alabama en Birmingham, Birmingham, Alabama, E.U.A.) proporcionó amablemente la cepa WU2. La cepa tipo 4 se obtuvo del CDC (Centro para Control y Prevención de Enfermedades).

50 Los neumococos se cultivaron de forma rutinaria en caldo de Todd-Hewitt (THB, Difco) con extracto de levadura al 0,5 % (p/v) a 37°C/CO₂ al 8 %. Cuando era apropiado, se añadió eritromicina y/o espectinomicina (Sigma-Aldrich, Bornem, Bélgica) a una concentración de 0,2 y 250 µg/ml; respectivamente.

Las cepas DH5α y JM109 de *Escherichia coli* (Gibco BRL, Life Technology) se cultivaron en caldo de Luria-Bertani (LBT, Difco) con o sin Bacto-agar (Difco) al 1,5 % (p/v) a 37°C durante 16 horas. Cuando era apropiado, se añadió eritromicina o espectinomicina al medio de crecimiento a una concentración de 100 µg/ml.

Para el estudio sobre la aparición de Pht, además de las 23 cepas propias y de la red de epidemiología molecular neumocócica (siglas del inglés: PMEN), TJ Mitchell (Escocia) proporcionó 34 aislados, RE Gertz (EE.UU.) 6, AB Brueggemann (RU) 2 y 9 provinieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

Antígenos

- 5 CbpA (o PspC) es una proteína recombinante truncada, como se describe en Brookes-Walter y col. J. Infect.Dis. 67; 6533-6542 (1999), que proporcionó amablemente JC Paton. La proteína se construyó a partir de la secuencia de la cepa D39 y por lo tanto pertenece al clado A. PspA (clado 2) y PsaA son proteínas recombinantes y se originan a partir de la cepa 2/D39 Ogunniyi y col. Infect. Immun. 68; 3028-3033 (2000), ambas proporcionadas por JC Paton.

Tratamiento y análisis de ADN

- 10 El ADN de plásmido de *Escherichia coli* se obtuvo utilizando el kit Plasmid Midi o Mini Purification (Qiagen Benelux, Venlo, Los Países Bajos). Los productos de PCR se purificaron con el kit de purificación para PCR QIAquick y los productos de digestión de ADN se purificaron en gel de agarosa al 1 % (p/v) utilizando el kit para extracción en gel QIAquick (Qiagen). Las enzimas de restricción y de ligamiento se obtuvieron a partir de New England BioLabs (Westburg, Leusden, Bélgica). Se utilizó el sistema Expand High Fidelity (Roche, Mannheim, Alemania) para cada
15 reacción de PCR de estos estudios. Todos los productos comerciales se utilizaron bajo las condiciones recomendadas por los proveedores.

- La determinación de secuencia de ADN se lleva a cabo con el kit para determinación de secuencia Big Dye Terminator en un secuenciador de ADN automatizado de Applied Biosystems (modelo 3100) (Applied Biosystems Inc, Forster City, CA, E.U.A.). Los análisis de secuencia se realizaron con el programa informático MacVector V6.5 (Oxford Molecular Ltd., Madison) o con el programa informático Vector NTI 7.1 (Informax), y las secuencias se compararon con la secuencia disponible del genoma de *S. pneumoniae* TIGR4 (www.tigr.org) {Peterson 2001}.
- 20

Extracción del ADN genómico de *S. pneumoniae*

- El ADN cromosómico de cada cepa se obtuvo recolectando el cultivo confluyente de una noche de una o dos placas de agar sangre altamente inoculadas en 1 ml de TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 5 mM; pH 7,8). La suspensión bacteriana se centrifugó en una microcentrífuga durante 5 minutos a velocidad máxima y el sedimento se resuspendió en 75 µl de TE. Los lisados celulares se obtuvieron mediante adición secuencial de 20 µl de lisozima (100 mg/ml) y de 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) e incubación a 37°C, 45 minutos. Después, se añadieron 500 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; NaCl 0,14 M; citrato de sodio 0,1 M; EDTA 1 mM, pH 8,0; desoxicolato de sodio al 0,1 % (p/v)) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al final de este periodo de
25 incubación, se añadieron 250 µl de acetato de amonio (7,5 mM, pH 7,7) al lisado crudo y se incubó 10 minutos en hielo. El ADN viscoso se extrajo dos veces con fenol/cloroformo/isoamilo (25:24:1) y se precipitó en alcohol isopropílico. El ADN resultante se lavó con etanol al 70 % (v/v) y se resuspendió en 50 µl de TE que contenía 0,6 µl de ARNasa A (10 mg/ml). Las suspensiones de ADN se reservaron a 4°C.
- 30

Aislamiento de ARN

- El ARN total se aisló a partir de neumococos cultivados a partir de una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,01 en THY hasta DO₆₀₀ diferentes para evaluar la expresión génica en diferentes fases de crecimiento (logarítmica inicial, DO₆₀₀ = 0,3; logarítmica tardía, DO₆₀₀ = 0,9; estacionaria, DO₆₀₀ = 1,2). Las células se centrifugaron y resuspendieron en Tris-EDTA sin ARNasa que contenía 6 mg de lisozima por ml y 1 mg de desoxicolato de sodio por ml, y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de incubar, se realizó el aislamiento del ARN con el
40 kit QIAGEN RNeasy Mini siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico contaminante se eliminó incubando las muestras de ARN con 1 unidad de ADNasa I por µg de ARN durante 1 hora a 37°C, seguido por inactivación de ADNasa con EDTA 2,5 mM durante 10 minutos a 65°C. El ARN total se cuantificó utilizando el kit para cuantificación de ARN Ribogreen® (Molecular Probes), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Amplificación rápida del extremo 5' de ADNc (RACE)

- El procedimiento utilizado para identificar los inicios de transcripción se adaptó de Ranasinghe y Hobbs {Ranasinghe 1998}. Brevemente, se utilizó un cebador específico para el extremo 3' del gen *phtE* para sintetizar el ADN complementario (ADNc) de primera cadena, a partir del ARN total con la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después se añadió ARNasa A durante 1 hora a temperatura ambiente para generar extremos 3' romos en el híbrido de ADNc-ARN. El híbrido se insertó en el plásmido pKS digerido con EcoRV (Stratagene) utilizando ADN ligasa T4 (incubación durante una noche, 16°C). Se estableció una
50 reacción de PCR para amplificar el extremo 5' utilizando otro cebador de *phtE* antisentido específico del extremo 3' y el cebador del promotor T7 específico de pKS. Se realizó la determinación de secuencia de la unión pKS-ADNc para identificar la base +1.

Identificación del terminador de la transcripción

La identificación del terminador se realizó utilizando el paquete Wisconsin Sequence Analysis versión 10.1 (Genetics Computer Group) a base del procedimiento de Brendel y Trifonov {Brendel 1984}.

RT-PCR

- 5 Los estudios de RT-PCR se realizaron de la siguiente manera. Primero se desnaturizó el ARN (2 µg) durante 5 minutos a 65°C en una mezcla que contenía cebador antisentido específico del extremo 3' del gen 10 µM y 20 unidades de ARNasaOut en un volumen total de 10 µl. Después se llevó a cabo la reacción de transcripción inversa mediante adición de ditiotreitól 5 mM, dNTP 1 mM, 15 unidades de transcriptasa inversa ThermoScript (Invitrogen), tampón para síntesis de ADNc 1X y agua estéril sin de ARNasa hasta un volumen de 20 µl. La mezcla de transcripción inversa se incubó a 56-58°C durante 1 hora, seguido por desnaturalización de la transcriptasa inversa durante 5 minutos a 85°C. La cadena de ARN en los híbridos de ARN-ADNc se degradó incubando la solución de transcripción inversa a 37°C durante 20 minutos con 1 unidad de ARNasa H. La reacción de PCR se llevó a cabo con 2 µl de ADNc utilizando diferentes cebadores sentido 5' específicos del gen y los cebadores antisentido 3' específicos del gen, utilizados para la reacción de transcripción inversa (concentraciones finales 0,5 µM), dNTP 0,2 mM, tampón para reacción de ADN polimerasa Taq, 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq (Amersham Biosciences) y agua estéril hasta un volumen de 50 µl. El ciclo de PCR consistió en desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido por 25-30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 15-30 segundos, hibridación a 55°C (*phtE*, *phtD*) o 63°C (*phtB*, *D*, *A*) durante 15-30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, y se completó mediante una final de extensión a 72°C durante 5-7 minutos. También se efectuó un control negativo constituido por ARN sin reacción de transcripción inversa para excluir la contaminación por ADN en la preparación de ARN. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio.

Preparación de mutantes de Pht

- 25 Se construyeron los vectores de mutador a partir del vector pGEM-T (Promega Benelux, Leiden, los Países Bajos), que se replica en *E. coli* pero no en *S. pneumoniae*. Estos contienen zonas recombinantes que corresponden a las regiones corriente arriba y corriente abajo de los genes *pht* que se van a suprimir, se amplificaron mediante PCR, que rodean a un gen de resistencia a antibiótico (los cebadores y sitios de restricción utilizados para construir los vectores mutadores se pueden proporcionar bajo pedido). Para preparar el mutante cuádruple deficiente en Pht, se tuvieron que utilizar dos genes diferentes de resistencia a antibiótico con el fin de combinar la delección en los dos locus diferentes (locus *phtD/phtE*, y locus *phtA/phtB*). Se seleccionó para el locus *phtD/phtE* un gen de resistencia a eritromicina (*ermB*), amplificado a partir de un derivado del vector pJDC9. Para el locus *phtA/phtB*, se utilizó un gen de resistencia a espectinomicina (gen *aad(9)*), purificado a partir del plásmido pR350 (que proveyó amablemente J Paton).

- 35 La clonación con los diferentes plásmidos construidos se realizó en las cepas DH5α o JM109 de *E. coli*, y se sembraron en placas de agar LB con los antibióticos respectivos. La transformación de *E. coli* con el ADN de plásmido se llevó a cabo mediante procedimientos estándar con células tratadas con CaCl₂ {Hanahan 1985}.

- 40 La cepa 4/CDC de *S. pneumoniae* se preparó para la transformación mediante dos etapas de crecimiento sucesivas, antes de resuspender en medio CTM (Casaminoácidos 10 g/l; 5 g/l de triptona; NaCl 5 g/l; extracto de levadura 10 g/l; K₂HPO₄ 0,4 M; glucosa al 20 %; glutamina 30 mg/ml; BSA al 1 %, CaCl₂ 0,1 M; pH 7,8) tomando alícuotas y congelando en glicerol al 15 %. Dichas alícuotas se utilizan para la transformación. Después de descongelar, se añadió CSP-1 o CSP-2 (100 ng/ml en medio CTM) para inducir la competencia, y las bacterias se incubaron a 37°C. Para optimizar la competencia se tomaron diferentes puntos de tiempo (5, 10, 15, y 20 minutos). Después de la adición de 1 µg del vector mutador, las células se incubaron a 32°C durante 30 minutos, con agitación, seguido por 2-4 horas a 37°C, en CO₂ al 5 %. Por último, las bacterias se sembraron en placas de agar sangre con los antibióticos apropiados. Para el mutante cuádruple, la cepa PhtD,E-KO se transformó con el plásmido que ocasiona la deficiencia de PhtA,B utilizando el mismo protocolo que se describió anteriormente.

SDS-PAGE y análisis por transferencia Western

- 50 Las suspensiones bacterianas destruidas con calor se obtuvieron recolectando el cultivo confluyente de una noche a partir de 5 placas de agar sangre altamente inoculadas, en 1 ml de PBS estéril (NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,2), y una etapa de incubación a 56°C durante 45 minutos. Después, se añadió tampón para muestra (base Trizma 60 mM, SDS al 1 % (p/v), glicerol al 10 % (v/v), azul de bromofenol al 0,01 % (p/v), β-mercaptoetanol al 2 % (v/v)) a las suspensiones destruidas con calor. Las preparaciones se hirvieron durante 5 minutos, se centrifugaron en una microcentrifuga a máxima velocidad durante 2 minutos y se separaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) según describe Laemmli {Laemmli 1970}. Las proteínas se transfirieron mediante electroforesis de los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Richmond, CA), como se describe {Towbin 1979}. Las membranas se sondearon con un anticuerpo policlonal de ratón generado contra PhtD, seguido por anti-IgG de ratón, de cabra, conjugado con fosfatasa alcalina (Promega Benelux.). Las bandas marcadas con enzima se visualizaron con un sistema de sustrato NBT/BCIP.

Crecimiento de cultivo en medio deficiente en iones

La cepa 4/CDC de tipo silvestre, y los correspondientes mutantes deficientes en PhtD y deficientes en Pht cuádruples se cultivaron bajo condiciones diferentes de empobrecimiento o complementación de ion en un medio sintético químicamente definido (MS) {SICARD 1964}. El medio MS se complementó mediante concentraciones cada vez mayores de, alternativamente, Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , o Zn^{2+} . Se controló la densidad óptica a 600 nm durante la fase logarítmica y en la fase estacionaria. Los resultados se compararon con los del tipo silvestre.

La cepa WU2 de tipo silvestre se cultivó con o sin el quelante específico de Zn, N,N,N',N',-tetrakis(2-piridilmetil)-etilendiamina (TPEN) para observar el efecto del empobrecimiento de cinc sobre la expresión de Pht a los niveles de ARN (mediante RT-PCR) y proteína (mediante citometría de flujo).

10 *Citometría de flujo*

Las bacterias WU2 se cultivaron en THB + extracto de levadura al 0,5 % a 37°C, CO₂ al 8 %, hasta la fase logarítmica. De manera alternativa, se añadió al medio TPEN 30 μ M, un quelante de cinc. Después de centrifugar, los sedimentos bacterianos se resuspendieron en una solución que contenía anticuerpos monoclonales anti-PhtE, anti-PhtB/D, anti PhtD/E o anti-polisacáridos tipo 3 como control. Después de 2 horas a 4°C, las soluciones se centrifugaron, los sedimentos bacterianos se lavaron en PBS-BSA al 2 % antes de incubarlos durante 1 hora a temperatura ambiente en anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con AlexaFluor™ (Molecular Probes) en PBS-BSA al 2 %. Después de lavar, las células se fijaron en PBS-formaldehído al 0,25 % y se realizó el análisis de FACS. Se registró la mediana de la fluorescencia de superficie.

PCR de transcriptasa inversa cuantitativa

20 El ARN total proveniente de la cepa D39 cultivada hasta una D.O ~ 0,5 (semi-log) se purificó utilizando el kit RNeasy™ Midi (Qiagen) y se cuantificó con el kit para ensayo de ARN Quant-iT™ RiboGreen™ (Invitrogen). Las muestras (1 g) se procesaron dos veces con 1,5 μ l de ADNasa RQ1 sin ARNasa (Promega) durante 30 minutos a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 1 μ l de ADNasa STOP seguido por incubación durante 10 minutos a 65°C. El ADNc de la primera cadena se generó utilizando la transcriptasa inversa Superscript™ II (Invitrogen), cebadores aleatorios (Invitrogen) y el inhibidor de ribonucleasa recombinante RNasin™ (Promega). La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un volumen de reacción de 50 μ l utilizando el kit de reactivos TaqMan™ PCR Core (Applied Biosystems), según describe por el fabricante. Se utilizaron los siguientes cebadores y sondas: *gyrB*, GGGAAATAGCGAAGTGGTCAAG (sentido), GGAATCGGAGAAGGCTTCAC (antisentido) y TTACCAATCGCCTCTTC (sonda); *phtD*, CCCATGCGGACAATATTCG (sentido), TGACTGCGTTCCTGCTTCTG (antisentido), CGTTTAATCTCTTCTTTTGT (sonda).

30 Todos los ensayos se hicieron por duplicado (desde el cultivo hasta PCR-c) y se analizó la transcripción relativa del gen mediante el procedimiento $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001) utilizando *gyrB* como control interno y crecimiento en THB solo como calibrador.

Determinación de la aparición de Pht

35 Con el fin de seleccionar cepas representativas de *S. pneumoniae*, se analizó la estructura de la población en conformidad con el genotipo de cepa según se determina mediante MLST (sigla del inglés de *Multilocus sequence Typing*: Tipo de Secuencia Multi-Locus; www.mlst.net). A base del Tipo de Secuencia (ST) de aislado de MLST, se determinaron los linajes clonales principales. Para cada grupo, se seleccionó una cepa representativa para el análisis de aparición, el cual se llevó a cabo mediante transferencia Western en extractos bacterianos enteros con anticuerpos policlonales anti-PhtD (reactividad cruzada con A, B y D) o anti-PhtE, y mediante PCR en ADN genómico neumocócico utilizando cebadores específicos para PhtA, B, D o E.

Determinación de secuencia de ADN para análisis de conservación de PhtD

45 El ADN de 107 cepas seleccionadas por MLST se amplificó mediante PCR utilizando cebadores de oligonucleótido específicos para PhtD. Las 107 secuencias se alinearon mediante el programa ClustalX y se calculó la identidad mediante el programa Superneedle (porcentaje de identidad es 100 x (número de identidades/longitud de la secuencia más corta)).

Ejemplo 1**Caracterización de los genes *pht****Organización genómica de los genes *pht**

50 En un trabajo previo, la determinación de secuencia de ADN de clones solapantes provenientes de una biblioteca genómica de la cepa SP64 de *S. pneumoniae* {Hamel 2004} y el análisis de PCR permitió la deducción de la organización genómica de los genes *pht* y de sus genes colindantes en esta cepa tipo 6B. Los genes *phtA* y *phtB*, así como los genes PhtD y PhtE, están organizados como un par. El análisis BLAST en el sitio en la red TIGR (www.tigr.org) {Peterson 2001} indicó que los dos tándems de genes están localizados separados aproximadamente

por 161 kpb en el genoma TIGR4 de *S. pneumoniae* y que la organización genómica es idéntica a la observada en la cepa SP64 (Figura 1). También se encontró la misma organización del gen *pht* en la cepa 4/CDC y en la cepa WU2, con la excepción de que *phtA* está perdido en ésta última (datos no mostrados). La determinación de secuencia de los genes *pht* que rodean al ADN de la cepa TIGR4 confirmó ésta última observación (datos no mostrados). Análisis adicionales demostraron que *phtA* y *phtB* están separados por 157 pb, mientras que *phtD* y *phtE* están separados por 209 pb en la cepa TIGR4, la cual se eligió para trabajos posteriores.

En el lado del tándem *phtD-phtE*, un gen que presenta 72 % de similitud de secuencia con los genes *lmb* de los estreptococos de los grupos A y B, que codifica las proteínas de unión a laminina (n.º de referencia AAK34689 {Ferretti 2001} y AAD13796 {Spellerberg 1999}, respectivamente), está localizado 7 pb corriente arriba del gen *phtD* (Figura 1). Recientemente, este producto de gen se denominó también como AdcAll, y se describió como una proteína de unión a cinc similar a transportador ABC {Loisel 2008}. Un ORF de 1392 pb, localizado a 142 pb corriente arriba del homólogo del gen *lmb*, codifica una proteína que presenta 64 % de similitud de secuencia con la proteína YfnA transportadora de metabolito de *Bacillus subtilis* (n.º de referencia D69814) y 81 % de similitud con una permeasa de aminoácido supuesta de *S. pyogenes* (n.º de referencia AAK33157) {Ferretti 2001, Kunst 1997}. Se encontró una secuencia que presenta 79 % de identidad con los primeros 481 pb de *phtE* (propuesto *phtF*) 226 pb después del codón de detención de *phtE* (Figura 1). Esta secuencia también muestra 72 % de identidad con los genes *phtA*, *B* y *D*.

En el lado del tándem de *phtA-phtB*, un ORF de 1332 pb, que presenta 73 % de similitud de secuencia con el gen *ptsl* de *Streptococcus salivarius* (número de referencia P30299) {Gagnon 1992}, se localizó 253 pb corriente arriba del gen *phtA* (Figura 1). Este gen presenta un desplazamiento del marco de lectura en la cepa TIGR4 al que se le determinó la secuencia y se comparó con el gen *ptsl* encontrado en la secuencia del genoma completo (n.º de referencia AAK75285). No se localizó ORF funcional inmediatamente corriente abajo de ambos pares de genes.

Ejemplo 2

Organización transcripcional de los genes *pht*

La organización genómica de los genes *pht* sugirió que los genes en tándem deberían transcribirse de manera coordinada. Por lo tanto, se realizaron estudios adicionales para examinar esta hipótesis. Primero, se identificaron los promotores y los sitios de unión a ribosoma supuestos de los genes *pht*. La 5'-RACE en el gen *phtE* permitió la identificación de su inicio de transcripción, a partir del cual se dedujo la región de promotor. Se encontró que el sitio de inicio de transcripción (+1) está localizado 96 bases corriente arriba del sitio de inicio de traducción de PhtE, corriente abajo de los sitios de unión de ARN polimerasa -10 y -35 de *S. pneumoniae* típicos {Morrison 1990} y corriente arriba de un sitio de unión a ribosoma (Figura 2a). Se encontró una organización de secuencia similar corriente arriba de los genes *phtA*, *phtB* e *yfnA*, lo que indica la presencia de promotores supuestos (Figuras 2b, c y e). Sin embargo, debido a la proximidad cercana del gen *lmb* (7 pb), no se identificó secuencia de promotor para el gen *phtD*. Por otro lado, una secuencia idéntica a las secuencias -35 de los otros genes *pht* se localizó corriente arriba del gen *lmb* (Figura 2d). Los sitios de unión a ribosoma se observaron 5 a 7 pb corriente arriba de todos los codones de inicio. También se identificaron los sitios de terminación de la transcripción del gen *pht* y genes adyacentes. El análisis por ordenador de las estructuras secundarias predichas de ARNm sugirió la presencia de estructuras similares a terminador de tallo lazo en los extremos 3' de los genes. Se podrían formar estructuras de horquilla con energías libres de disociación (ΔG) calculadas de -9,4, -27,0, -16,8, y -21,6 kcal/mol para *phtB*, *phtD*, *phtA*, y *ptsl* respectivamente, según se determina mediante el procedimiento de Turner y col. (1988) {Turner 19988} (Figura 3a). De hecho, el terminador identificado para el gen *phtD* fue idéntico al reportado por el sitio en la red TIGR para ORF SP1003, el cual corresponde al homólogo del gen *phtD* (www.tigr.org). No se identificaron terminadores de la transcripción por el grupo TIGR para los otros genes *pht* o genes circundantes, reflejando probablemente diferencias en los algoritmos utilizados por ambos estudios. La mayoría de las horquillas acababan con un tramo de restos T, como el típicamente encontrado en los terminadores de la transcripción procariotas {Rosenberg 1979} y se localizan dentro de 70 pb corriente abajo de los codones de detención (Figura 3). De manera interesante, la secuencia de terminador de *phtE* (ΔG de -4,7 kcal/mol) se localizaba 1867 pb corriente abajo de su codón de detención y del gen *phtF*, conteniendo el último ORF codones de detención en marco que evitan su traducción (Figura 3a). No se identificaron secuencias de terminador corriente abajo de los genes *yfnA* e *lmb*.

La organización genómica sugirió que *phtE* podría ser parte de un operón constituido por los genes *yfnA*, *lmb*, *phtD*, *phtE* y *phtF*. No obstante, la 5'-RACE (Figura 2a) y la identificación del terminador (Figura 3a) indicaron que *phtE* era el primer gen transcrito en un mensaje bicistrónico, constituido por los genes *phtE* y *phtF*, lo cual se confirmó mediante RT-PCR. Las regiones *phtE* a *phtF* se amplificaron mediante RT-PCR (Figura 4a, carriles 4 y 6), mientras que no se obtuvo producto de amplificación con el par de cebadores específicos para la región entre los genes *phtD* y *phtE* (Figura 4a, carril 5), lo que indica la terminación de la transcripción corriente abajo de *phtD* (Figura 3c).

Como se muestra en la Figura 4a (carriles 1 a 3), la RT-PCR amplificó las regiones *yfnA* a *phtD*. Además, Loisel y col. {Loisel 2008} han demostrado que este transcrito de *phtD* también codifica, además de *yfnA*, *lmb* y *phtD*, los dos genes corriente arriba de *yfnA* (*ccdA*, que está implicado en la biogénesis del citocromo c y *spr0904* que presenta similitud con tiorredoxina). Como un aspecto interesante, la identificación de un promotor supuesto corriente arriba del gen *lmb* (Figura 2d) sugirió acoplamiento transcripcional de los genes *phtD* e *lmb*.

Los resultados obtenidos para los genes *phtB* y *phtA* mostraron que estos se transcriben como moléculas de ARNm monocistrónicas, como sugirió la identificación de los sitios de promotor (Figura 2b y 2c) y de terminador (Figura 3b y 3d). El análisis de la organización transcripcional de *phtA* y *phtB* mediante RT-PCR con cebadores específicos de *phtB*, reveló un amplicón específico de *phtB* (Figura 4a, carril 7). No se obtuvo producto de amplificación mediante RT-PCR con cebadores que amplifican la región entre *phtA* y *phtB* (Figura 4a, carril 8), lo que indica una organización monocistrónica de los genes *phtA* y *phtB*. La identificación del sitio de terminador (Figura 3e) indicó que *ptsI* se transcribe como un mensaje monocistrónico, lo cual también confirma que *phtA* no es parte de un transcrito policistrónico.

Ejemplo 3

10 Construcción y uso de mutantes de Pht

Caracterización de los mutantes

Se construyeron los mutantes PhtA⁻, PhtB⁻, PhtD⁻, PhtE⁻, y el mutante cuádruple PhtABDE⁻. Para evaluar la exactitud de la recombinación, se purificó el ADN genómico de las cepas mutantes y las regiones recombinantes se sometieron a determinación de secuencia (datos no mostrados). Asimismo, los mutantes se caracterizaron fenotípicamente mediante inmunotransferencia, utilizando un anticuerpo anti-PhtD policlonal de ratón (Figura 5). Este anticuerpo reconoció los cuatro isotipos de Pht. Sin embargo, las bandas de PhtE serán más tenues, lo que confirmó la gran divergencia de esta Pht con respecto a las otras tres.

Influencia de diversos iones sobre el crecimiento bacteriano

El crecimiento del mutante cuádruple de Pht disminuyó dramáticamente en medio MS, en comparación con el de la cepa de tipo silvestre y de los diferentes mutantes únicos de Pht (Figura 6a). Cuando el medio se complementó con hasta 200 μM de Fe^{2+} , Zn^{2+} , o Mn^{2+} , el crecimiento del tipo silvestre y del mutante deficiente en PhtD mejoró ligeramente (velocidad de crecimiento contra MS solo: 96-130 %). Por el contrario, el comportamiento del mutante cuádruple fue sorprendente. Mientras que la adición de 200 μM de Fe^{2+} al MS solo indujo un aumento del crecimiento del 25,3 % (Figura 6d), la misma concentración de Zn^{2+} o Mn^{2+} restableció la habilidad de crecimiento del mutante cuádruple (Figura 6b,c). Esto representa hasta el 92,3 % de aumento en la velocidad de crecimiento, en comparación con la obtenida en MS solo. Sin embargo, esta recuperación de la velocidad de crecimiento era retardada, solamente visible después de incubación durante una noche, ya que no era visible la mejora dentro de las primeras horas de cultivo. La adición de Mg^{2+} no restableció el crecimiento de forma completa a 200 μM , como lo hizo Zn^{2+} o Mn^{2+} , pero se obtuvo aumento similar en las velocidades de crecimiento cuando se añadió Mg^{2+} 1 mg/ml al MS (datos no mostrados). La adición de concentraciones altas de Cu^{2+} fue tóxica para las cepas del tipo silvestre y mutantes (datos no mostrados).

Ejemplo 4

Efecto del empobrecimiento de cinc sobre la expresión de pht

Quando el quelante de cinc TPEN se añadió al medio de cultivo, se aumentó el nivel de expresión de las proteínas Pht, como se determinó mediante experimentos de citometría de flujo (Figuras 7 a,b,c). Como un control, no se observó cambio en la fluorescencia promedio con anticuerpo anti-polisacárido tipo 3 en las mismas condiciones de empobrecimiento de cinc (Figura 7d). Al nivel de ARN, mediante RT-PCR se pudo medir un aumento de hasta 25 veces en el nivel de transcripción de *phtE* en la condición de empobrecimiento de cinc (datos no mostrados).

Además, se realizaron experimentos de RT-PCR-c utilizando ARNm purificado proveniente del aislado neumocócico (cepa D39) cultivado ya sea en THB o en THB + TPEN 25 μM . La concentración del quelante añadida al medio fue sub-óptima, según se determinó con experimentos preliminares, lo que significa que TPEN no evitaba el crecimiento (como se observó cuando la concentración de TPEN era lo suficientemente alta como para quelar todos los iones en el medio), pero lo retrasaba (datos no mostrados). La adición de TPEN al medio daba como resultado un aumento de 4,84 veces en el nivel de expresión del ARNm de *phtD*. La complementación de THB+TPEN con ZnSO_4 25 μM restauró la expresión del ARNm de *phtD* hasta un nivel similar al observado en medio solo, lo que sugiere que entre todos los iones que puede quelar TPEN (Zn, Mn, Cd, Co, Ni, Cu, Mg, Ca), Zn tiene el mayor impacto sobre el nivel de expresión de *phtD*.

Ejemplo 5

Presencia de Pht en neumococos

En total, se investigaron 74 cepas (incluyendo 23 cepas PMEN y propias). En este conjunto de cepas representativas, estaban representados 18 linajes clonales, 46 cepas (61 %) con 27 ST diferentes que pertenecían a los 3 grupos clonales principales (1, 11 y 23), estaban presentes 56 ST diferentes, entre los cuales los más representados eran 81, 90, 124, 156, 162 y 199 (22 cepas), y estaban presentes 27 serotipos diferentes, entre los cuales los más representados eran 19F, 6B, 3, y 23F (47 % de todas las cepas).

Mediante PCR en ADN genómico, se encontraron los genes de PhtD, PhtE, PhtB y PhtA en el 100 %, 97 %, 81 %, y 62 % de las cepas, respectivamente. Se encontró que el cincuenta y cuatro por ciento de las cepas portaban los cuatro genes *pht* en sus genomas. En las inmunotransferencias con anticuerpos policlonales generados contra PhtD, se pudo detectar la PhtD en todas las cepas. De igual manera, las otras Phts se encontraron mediante inmunotransferencia en todas las cepas que portan sus genes respectivos. De manera notable, debido a la gran divergencia genética, la PhtE se detectó de manera más adecuada con un anticuerpo policlonal específicamente generado contra ésta (Figuras 8). Se encontraron algunas Phts peculiares, tal como una PhtE de un tamaño más bajo (10 kDa más pequeña) en 6 aislados, y de un tamaño incluso más pequeño (20 kDa menos) en 8 cepas. De igual manera, se encontró que 4 cepas producían una PhtA truncada (Figuras 8), cuyo gen no se detectó mediante PCR. Como un aspecto interesante, estas 4 cepas también expresaban la PhtE truncada en 20 kDa. Al menos, la determinación de secuencia del locus de *phtA/B* de las cepas *phtB* negativas ha revelado que el único gen presente en este locus es un híbrido entre cualquiera de los genes *phtA* y *phtB* o *phtA* y *phtD*.

Como un aspecto interesante, el análisis de secuencia ha demostrado que la secuencia señal que codificaban los genes *pht* era específica para cada uno de los miembros de la familia Pht. En efecto, la secuencia señal específica de un miembro de la familia Pht difiere al menos en una posición con la secuencia señal de otro miembro de la familia Pht (véase tabla 1).

Después, se intentó determinar si se pueden hacer vínculos entre el perfil de expresión de Pht y el genotipo/serotipo del aislado. En las cepas analizadas, todos los aislados de los serotipos 2, 4, 14, 6B y 7F poseían las 4 Phts, y todos los aislados de los serotipos 3, 9, 19F y 22F carecían de PhtA o portaban una PhtA más pequeña. Acerca de un vínculo potencial entre el genotipo MLST y el perfil de expresión de Pht, se pudieron determinar las siguientes características: la PhtE truncada en 10 kDa se encontró principalmente en el grupo del genotipo ST 199. Los serotipos de estas cepas eran 19F, 19A, 15A, 1 y 6A. La PhtE truncada en 20 kDa se observó en 8 aislados que pertenecían todos al mismo linaje clonal (grupo 1), pero que portaban diferentes serotipos (9, 19A, 19F, 14). Por último, las cepas que carecían de PhtA se observaron en linajes clonales diferentes. Por lo tanto, no se identificó un vínculo importante entre la falta de PhtA y el genotipo.

Ejemplo 6

Conservación de *PhtD*

En el estudio de la presencia de Pht, se encontró que PhtD está presente entre todas las cepas neumocócicas analizadas, lo que la designa como la mejor candidata para vacuna entre la familia Pht. En este sentido, se encontró esencial determinar el nivel de conservación de secuencia entre las cepas neumocócicas. Para esto, se efectuó la determinación de secuencia de ADN.

A partir del análisis de 107 cepas (a base de la clasificación MLST), se determinó que la longitud de PhtD varía entre 831 y 853 aminoácidos con una masa molecular de alrededor de 100 kDa. Se encontró que PhtD está altamente conservada entre las 107 cepas analizadas y solamente 1 secuencia presentó una señal de detención para una proteína truncada (cepa 4/75). La región rica en prolina contiene 13-15 prolinas para todas las cepas (en 7 cepas, solamente 11-13 prolinas). Se encontraron tramos limitados de variabilidad <4 aminoácidos en la secuencia de PhtD.

Discusión

Las proteínas Pht son candidatos prometedores para incorporarlos en una vacuna contra enfermedades infecciosas neumocócicas. En este sentido, parece crucial investigar cómo se regula la expresión de estas proteínas, con el fin de definir de manera más adecuada su papel en la patogénesis neumocócica.

El análisis genómico mostró que los cuatro homólogos génicos están dispuestos en tándem. También se demostró la presencia de un quinto miembro, aunque truncado, de la familia génica *pht*, corriente abajo del gen *phtE*, lo que confirma el hallazgo en un estudio previo {Adamou 2001}. Al parecer este truncamiento se conserva debido a que se encontró la misma organización en el genoma de la cepa R6 de *S. pneumoniae* (n.º de referencia AAK99714) {Hoskins 2001}.

El presente estudio muestra que la organización en tándem de los genes *pht* no se correlaciona con una transcripción bicistrónica de *pht*. Ninguno de estos genes se cotranscribió con su *pht* vecino relacionado, en las condiciones analizadas. El análisis del promotor y el terminador se correlaciona bien con los estudios de RT-PCR tradicional. Los inventores del presente documento demuestran que los genes *phtB*, *phtA* y *phtE* poseen todos promotores supuestos individuales y que dicha transcripción de ARNm probablemente termine poco después de los codones de detención correspondientes. Por otro lado, se observó una peculiaridad del gen *phtD*. En efecto, no se identificó promotor *in silico* para *phtD*. En cambio, se identificaron promotores, pero no terminadores de la transcripción para los genes *lmb* e *yfnA*, dos genes localizados corriente arriba de *phtD*, lo cual tiende a indicar que dichos genes están organizados en un sistema de operón. Esto corrobora el hallazgo reciente que *phtD* puede expresarse en un sistema de operón grande junto con los 4 genes corriente arriba {Loisel 2008}. No obstante, el hecho que se identifique un promotor para *yfnA* y para *lmb* indica que la transcripción puede comenzar en estas ubicaciones, lo que significa que se pueden producir transcritos de diferente longitud que contienen *phtD*. Además, se identificó un sitio de unión a *adcR* corriente arriba del gen *lmb* {Loisel 2008, Panina 2003}, lo cual tiende a decir

que también puede existir un transcrito bicistrónico regulado por cinc con *lmb* y *phtD*, lo cual ha sido sugerido por otros autores. Los estudios hechos por Spellerberg y col. {Spellerberg 1999} mostraron que el gen *lmb* estreptocócico del grupo B (EGB) se cotranscribe con un gen cuyo producto presenta 67 % de similitud de secuencia con los primeros 225 (*phtE*) y los primeros 228 (*phtA*, *phtD* y *phtB*) aminoácidos de los productos del gen *pht* (n.º de referencia AF062533). También se observa un ordenamiento genómico comparable en el genoma estreptocócico del grupo A (EGA) {Ferretti 2001}. Adicionalmente, se propuso que la cotranscripción de *lmb* y *phtD* podría indicar un vínculo funcional, en el que el producto génico de este último está implicado en la adhesión e invasión neumocócica {Panina 2003}.

Es interesante indicar que el gen *phtD* se puede transcribir como un mensaje policistrónico con los otros dos genes, *yfnA* e *lmb*, que puede estar implicado en actividades de transporte y de unión específica, respectivamente. En efecto, se cree que *YfnA* en *S. pneumoniae* {Hoskins 2001}, y las proteínas homólogas en *B. subtilis* {Yamamoto 1997}, *S. pyogenes* {Ferretti 2001}, y *S. mutans* {Ajdic 2002} son transportadores de aminoácido, miembros de la superfamilia de las permeasas. En cuanto a la proteína *Lmb*, se ha descrito como una proteína de unión a cinc similar a transportador ABC {Loisel 2008} y como una proteína de unión a laminina supuesta {Spellerberg 1999}. En efecto, esta proteína demuestra similitudes con una familia de adhesina conocida como *Lral*, encontrada inicialmente en estreptococos orales {Jenkinson 1994}, pero desde entonces descubierta después en otros estreptococos y géneros {Cockayne 1998}. Se sugirió que las proteínas similar a *Lral* están implicadas en la colonización del epitelio humano por estreptococos y su posterior invasión del torrente sanguíneo {Elsner 2002}. No es claro por qué *yfnA*, *lmb*, y *phtD* están asociados en un sistema de operón. Una hipótesis posible es que estas tres proteínas son necesarias en el mismo momento del ciclo bacteriano, para invasión o crecimiento, por ejemplo, sin que necesariamente estén asociadas en sus funciones. Sin embargo, la determinación del papel de las proteínas Pht podría dar alguna pista de su asociación genómica. Se puede especular que las similitudes entre las proteínas Pht intraespecies son indicativas de papeles intercambiables. También podría ser que las proteínas compartan funciones similares a través de sus regiones homólogas y, al mismo tiempo, ejerzan actividades distintas, incluso en fases diferentes del desarrollo de la bacteria. Los resultados obtenidos por los inventores en análisis de inmunotransferencia con extractos de proteína provenientes de los diversos mutantes deficientes en Pht que los inventores se han producido, tienden a mostrar que no hay compensación por pérdida de gen mediante aumento del nivel de expresión de los productos de los genes de *Pht* restantes. Esta característica también se describió recientemente a nivel de ARN, utilizando RT-PCR {Ogunniyi 2009}.

Como ya se mencionó, todas las proteínas Pht comparten motivos de triada de histidina {Adamou 2001, Hamel 2004, Zhang 2001}, que se cree están implicadas en la unión a metal. Como un aspecto interesante, se ha especulado que estos motivos podrían estar implicados en la unión a cinc, especialmente para generar proteínas Pht funcionales desde el punto de vista conformacional {Panina 2003}. Los mismos autores también plantean la hipótesis que un entorno restringido en cinc podría inducir la expresión de las proteínas Pht y favorecer la colonización e invasión por *Streptococcus*. En este contexto, se efectuaron experimentos en los cuales se cultivaron cepas de tipo silvestre y deficientes en Pht en diferentes condiciones de empobrecimiento y complementación de iones. En un medio sintético mínimo, las cepas de tipo silvestre y deficiente en PhtD crecieron más lentamente que en medio LB enriquecido, pero se observó que casi no hubo crecimiento del mutante cuádruple deficiente en Pht en el medio mínimo. De manera sorprendente, cuando se añade Zn^{2+} o Mn^{2+} , y esto fue en particular visible a concentraciones en el intervalo de 20-200 μM , el crecimiento del mutante cuádruple se restableció hasta el del tipo silvestre. Sin embargo, los resultados de los inventores muestran que el crecimiento del mutante cuádruple estaba retrasado, en comparación con el tipo silvestre.

Estas observaciones, además de confirmar la necesidad de Zn^{2+} y Mn^{2+} para el crecimiento bacteriano, arguyen un papel crítico de la familia Pht en la captación de Zn^{2+} y Mn^{2+} . El hecho, como fue observado por los inventores, de que la carencia de Zn^{2+} induce la síntesis *de novo* de proteínas de la familia Pht es un argumento adicional para sustentar una relación estrecha entre Pht y Zn^{2+} . Esta regulación probablemente se produce a través de la proteína *AdcR*, que regula la captación de cinc en *S. pneumoniae*. En efecto, se han encontrado sitios de unión supuestos para la proteína *AdcR* corriente arriba de los genes *phtA*, *phtB*, y *phtE*, y del operón *lmb-phtD* {Panina 2003}. La unión de *AdcR*, inducida en condiciones de concentraciones altas de Zn^{2+} , inhibe la transcripción de los genes bajo su dependencia. Bajo condiciones de inanición directa o indirecta de cinc, y por tanto reducción en la concentración intracelular de este metal, se alivia la represión por *AdcR* {Brenot 2007, Claverys 2001}. Contrario a esto y a lo que se ha observado en el presente estudio, recientemente se publicó que la adición de cinc en el medio de cultivo suscita la producción de Pht {Ogunniyi 2009}. Sin embargo, los dos procedimientos utilizados son distintos en el sentido que, en el presente trabajo, el cinc se retira de un medio enriquecido en cinc mientras que Ogunniyi y col. agregan cinc a un medio pobre en cinc. Es razonable estimar que la producción de Pht se regula en una manera con forma de campana dentro de un intervalo dado de concentraciones de cinc. Además, los efectos de la concentración alta de cinc que observaron Ogunniyi y col. {Ogunniyi 2009}, que conducen a la expresión aumentada de Pht, pueden tener poca relevancia *in vivo* ya que las concentraciones de cinc libre disponibles en el hospedero humano son muy bajas.

En 1997, Dintilhac y col. {Dintilhac 1997a} concluyeron en su estudio que, además de *Psa*, descrita como una permeasa de Mn^{2+} tipo ABC, y de *Adc*, una permeasa de Zn^{2+} de tipo ABC, debería existir un tercer transportador, capaz de transportar tanto Zn^{2+} como Mn^{2+} . Las proteínas Pht o la proteína de unión a laminina podrían aparecer como candidatos para cumplir esta función. Los resultados del presente estudio son indicativos de un papel diferente

para las Phts. En efecto, el hecho que las cepas de tipo silvestre y las deficientes en PhtD sean capaces de crecer en medio mínimo sin Zn^{2+} y Mn^{2+} es intrigante. Además, también es intrigante la observación de que el crecimiento del mutante cuádruple se rescató con un retraso cuando se añadió Zn^{2+} o Mn^{2+} al medio mínimo. Estas observaciones se podrían explicar si se considera que las proteínas Pht actúan como eliminadores de Zn^{2+} y Mn^{2+} , con la función de almacenar y concentrar dichos cationes divalentes. Cuando las cepas de tipo silvestre y deficientes en PhtD se pusieron en medio mínimo, éstas fueron capaces de empezar a crecer inmediatamente gracias a los iones almacenados previamente dentro de las proteínas Pht, cuando las bacterias estaban en un medio más rico. En contraste, los mutantes Pht cuádruples no pudieron almacenar dichos iones cuando se colocaban en condiciones favorables, y después no pudieron crecer cuando se ponen en medio empobrecido. Cuando se añadió Zn^{2+} o Mn^{2+} en exceso al medio mínimo, es necesario algo de tiempo antes de que las permeasas de metal específicas pudiesen atrapar los iones, debido a que éstas tienen que encontrarlos al azar en el medio de cultivo, sin ayuda de las proteínas Pht. Esto podría explicar el retraso necesario para que el mutante Pht cuádruple comience a crecer en tales condiciones. Asimismo, un posible papel eliminador para las proteínas Pht es consistente con la presencia de cinco a seis dominios de unión a catión.

Este mecanismo especulativo de almacenamiento, si se confirma, podría considerarse como un medio para que la bacteria regule la homeostasis de cinc y probablemente de manganeso. Los iones metálicos tales como cinc y manganeso son elementos traza esenciales. Sin embargo, estos son potencialmente dañinos para las bacterias cuando están en exceso, debido a que éstos pueden competir con otros elementos como cofactores para algunas enzimas críticas. Por lo tanto, es esencial que la bacteria regule la homeostasis de metal, y se sugiere que este es el papel principal de la familia Pht. Dicho sistema regulador permitiría que *S pneumoniae* sobreviva cuando se enfrenta a entornos limitados en cuanto a iones, por ejemplo durante las etapas iniciales del proceso de colonización en la nasofaringe humana {Bunker 1984, Harlyk 1997}.

La existencia de transcritos policistrónicos con PhtD podría explicarse por la necesidad de Zn^{2+} o Mn^{2+} para Lmb, un miembro de la familia Lral, e YfnA, para ejercer su función. Para apoyar parcialmente esta afirmación, se ha sugerido que Mn^{2+} es necesario para la adhesión a través de la familia de proteínas Lral, una característica crítica para virulencia la {Dintilha 1997b, Papp-Wallace 2008}. Además, se ha demostrado en otros contextos que la laminina une Zn^{2+} para promover la unión de alta afinidad entre la laminina y las proteínas de unión a laminina {Ancsin 1996, Bandyopadhyay 2002}. Por lo tanto, se puede plantear la hipótesis que Lmb necesita a PhtD para asegurar la presencia de Zn^{2+} cuando Lmb encuentra a la laminina, lo cual aumenta la unión a los tejidos del hospedador. La regulación de la homeostasis de cinc por las Phts también podría explicar por qué estas proteínas se han asociado con la inhibición de C3b (Hostetter, 1999 41 /id; Ogunniyi, 2009 98 /id). En efecto, la escisión de C3b por el factor I en presencia del factor H se regulado por cinc {Blom 2003}. Controlando la concentración de cinc en el entorno bacteriano, las Phts podrían contribuir así, en algunas circunstancias, a la inhibición de C3b, lo cual necesita ser investigado adicionalmente.

Por lo tanto, eligiendo como blanco la familia de proteínas Pht, el sistema inmune puede impedir la posibilidad de que las bacterias almacenen y utilicen los iones, lo cual parece ser crucial para el proceso de invasión. Por consiguiente, los presentes resultados confirman a las proteínas Pht como candidatos genuinos para vacunas contra infecciones neumocócicas. Los diferentes miembros de la familia Pht ya han sido evaluado respecto a su potencial para ser utilizados como antígenos para vacunas neumocócica {Adamou 2001, Hamel 2004, Ogunniyi 2007, Zhang 2001}. Después de su descubrimiento, PhtA, PhtB y PhtD se examinaron respecto a su capacidad para proteger a los ratones contra un subconjunto de aislados neumocócicos {Adamou 2001}. Se encontró que PhtD es la proteína Pht que proporciona la protección más amplia, mientras que la inmunización con PhtA es eficaz contra un número más pequeño de las cepas analizadas. Esto está en línea con los resultados del presente estudio, en el cual se muestra que PhtA se expresa en el 62 % de las cepas neumocócicas, mientras que PhtD está presente en el 100 %. Aunque se utilizó satisfactoriamente en dos estudios, el potencial de PhtB para suscitar protección cruzada se desconoce ya que ésta se evaluó solo contra una única cepa {Adamou 2001, Zhang 2001}. Sin embargo, debido a que se lo encontró en el 81 % de las cepas, se podría esperar que su cobertura entre cepas podría no ser óptima. Acerca de PhtE, esta proteína se encontró en el 97 % de las cepas, lo cual podría ser indicativo de una protección cruzada amplia. Sin embargo, esta Pht comparte solamente el 32 % de identidad con las otras tres Phts, y su parte C-terminal, la más inmunogénica y conservada, es específica de PhtE. La región de PhtE común con las otras Phts no es accesible a los anticuerpos {Adamou 2001, Hamel 2004}. Por lo tanto, PhtD, presente en todas las cepas analizadas, con una secuencia de aminoácidos altamente conservada entre los neumococos y que también demuestra reactividad cruzada con PhtA y PhtB, representa una mejor opción.

Ejemplo 7

La inmunización con proteínas pht confiere protección en un modelo de exposición intranasal letal neumocócica en ratón

Para evaluar la protección obtenida por los miembros de la familia Pht en un la exposición intranasal neumocócica en ratón, se inmunizaron ratones OF1 hembra (cuatro semanas de edad; n=20/grupo) por vía intramuscular (i.m.) en el día 0 y 14 con 1 µg de PhtD, PhtA, PhtB, o PhtE, formuladas con el Sistema de Adyuvante AS02 que consiste en una emulsión aceite en agua complementada con 3-O-desacil-4'-monofosforil-lípido A (MPL) y QS21 (Garçon y col. Expert Rev. Vaccines 6; 723-739 (2007)). Los animales de control se inyectaron con AS02 solo. En el día 28, los

ratones se expusieron por vía intranasal a la cepa neumocócica tipo 3/43 (10^5 ufc en 50 μ l). La mortalidad se registró para los 10 días después de la exposición.

En otros experimentos, la vacunación con 1 μ g de PhtD se comparó con 10 μ g de PspA y 10 μ g de CbpA. Todos los antígenos se formularon con el Sistema de Adyuvante AS04, que consiste en sales de aluminio con MPL (Garçon y col. *Expert Rev. Vaccines* 6; 723-739 (2007)). Las inmunizaciones i.m. se produjeron en el día 0, 14 y 28. Los animales de control se vacunaron con adyuvante solamente. En el día 42, los ratones se expusieron por vía intranasal a *S. pneumoniae* tipo 4/CDC (5×10^6 ufc), tipo 2/D39 (2×10^5 ufc), o tipo 3/43 (10^5 ufc) en 50 μ l. La mortalidad se registró para 10 días después de la exposición. Los datos de supervivencia se analizaron con la prueba logrank (Mantel-Haenszel).

Los resultados indican que la vacunación con cualquiera de las proteínas Pht permite la supervivencia de aproximadamente el 60 % de los ratones, mientras que solamente el 20 % de los animales sobrevivió en el grupo de control (Figura 10).

En experimentos posteriores, se vacunaron otros grupos de animales con tres antígenos neumocócicos diferentes, PspA, CbpA, y una proteína de la familia Pht, específicamente PhtD. Se evaluó el grado de la respuesta humoral y dos semanas después de la última inmunización los animales se expusieron a tres cepas neumocócicas diferentes. Se registró la supervivencia de los ratones para todas las combinaciones de antígeno/cepa. Los niveles resultantes de anticuerpos fueron dependientes del antígeno (Figura 11A). La vacunación con 1 μ g de PhtD suscitó títulos de anticuerpo más altos que la vacunación con 10 μ g de CbpA o PspA. No obstante, el nivel de protección contra la exposición letal intranasal a la cepa 2/D39, a partir de la cual se originan CbpA y PspA, fue similar para los tres antígenos, con alrededor del 70 % de supervivencia (figura 12A). Las diferencias entre los antígenos se evidenciaron cuando se utilizaron otras cepas. En efecto, la vacunación con PhtD permitió que el 60 % y el 80 % de los ratones sobreviviesen a la exposición con las cepas 3/43 y 4/CDC, respectivamente. En contraste, CbpA y PspA no proporcionaron protección o proporcionaron protección muy débil contra las exposiciones a los tipos 3 y 4. Por lo tanto, PhtD es el único antígeno que puede proporcionar protección contra las tres cepas.

Ejemplo 8

La inmunización con proteínas Pht protege a los ratones contra la colonización nasofaríngea de S. pneumoniae

Se utilizó un ensayo de colonización nasofaríngea para evaluar la capacidad de inmunización contra PhtD para prevenir la otitis media. Varios estudios han demostrado un vínculo entre la colonización nasofaríngea y la otitis media. Bogaert y col. *Lancet Infect. Dis.* 4(3); 144-154 (2004) muestran que las tasas de colonización tienden a ser más altas durante la infección del tracto respiratorio y la otitis media. En efecto, la enfermedad neumocócica no se produciría sin la colonización nasofaríngea precedente y/o concurrente con la cepa homóloga (Grey y col. *J. Infect. Dis.* 142; 923-933 (1980), Syrjane y col. *Paediatr. Infect. Dis. J.* 24; 801-806 (2005)).

Se inmunizaron ratones Balb/c (cuatro semanas de edad; n=10/grupo) en los días 0, 14 y 28 por vía intranasal con 5 μ g de PhtD, PhtA, PhtB, o PhtE complementados con 0,2 μ g de toxina lábil (TL) de *E. coli* como un adyuvante (excepto en la última inmunización). Otro experimento con el mismo protocolo (programa y dosificaciones) consistió en comparar PhtD con CbpA, PsaA, y PspA. Los ratones de control se inyectaron con TL sola. En el día 42, los ratones se expusieron por vía intranasal a 7×10^4 ufc de la cepa tipo 6B/CDC, tipo 4/CDC, o tipo 2/D39. Las exposiciones se efectuaron utilizando un volumen de inóculo bacteriano pequeño (10 μ l). Las colonias bacterianas se contaron en los lavados nasales recolectados 2 y 6 días después de la exposición. Los lavados nasales se obtuvieron por lavado abundante con 500 μ l de PBS del interior de la cavidad nasal de ratones anestesiados. Después, para contar las colonias bacterianas, 100 μ l del lavado nasal se diluyeron 10 veces en caldo de Todd Hewitt. A partir de esto, 10 μ l se sembraron en placa en base de agar sangre Difco™, complementado con sangre estéril, desfibrinada de borrego y gentamicina (3 μ g/ml). La placa de Petri se inclinó para diseminar la muestra y las colonias se enumeraron después de incubar durante una noche a 37°C. Todos los datos de los recuentos de colonia, después de la normalización, se compararon con ANOVA, seguido por la postprueba de Dunnett cuando la ANOVA se encontró significativa.

Para evaluar la actividad protectora de la vacunación contra la colonización nasofaríngea, se inmunizaron ratones Balb/c por vía intranasal con las diferentes proteínas Pht antes que éstos se expusiesen por la misma vía a la cepa 2/D39. Como se puede observar en la figura 13, aunque solamente la vacunación con PhtD o PhtE proporcionó protección significativa contra la exposición a la cepa tipo 2, todos los miembros de la familia Pht fueron capaces de reducir la carga bacteriana en la nasofaringe de los animales vacunados. Debido al mejor desempeño de PhtD en este modelo, este miembro de la familia Pht se eligió para experimentos adicionales, que consisten en comparar PhtD con otras proteínas neumocócicas. Por lo tanto, los ratones se inmunizaron con diferentes antígenos neumocócicos, incluyendo PhtD, y posteriormente se expusieron a una cepa tipo 2, una cepa tipo 4 o una cepa tipo 6B.

Como se observó después de la inmunización sistémica, las respuestas humorales suscitadas después de la inmunización intranasal fueron dependientes del antígeno (figura 11B). En particular, CbpA suscitó títulos de anticuerpos más bajos que PspA y PhtD. Sin embargo, el nivel de protección proporcionado por CbpA contra la cepa

2/D39 homóloga de clado fue similar al de PspA y PhtD (figura 14A).

5 Cuando se utilizó para la exposición la tipo 4/CDC, solamente la inmunización con PhtD pudo proteger a los animales contra la colonización nasofaríngea, mientras que la inmunización con CbpA, PsaA o PspA no fue estadísticamente distinguible del control con TL (figura 14B). Por último, la exposición al tipo 6B/CDC no evidenció
 10 ninguna diferencia en la protección en el día 2 después de la exposición, ya sea que los animales se inmunizaran con CbpA, PspA o PhtD (figura 14C). Solo PsaA pareció ser menos eficiente en ese respecto. En el día 6 después de la exposición, no había diferencia estadística entre todos los grupos. Sin embargo, un examen cuidadoso de los resultados para PhtD reveló que la mayoría de los animales estaban protegidos contra la colonización nasofaríngea y que la conclusión estadística desfavorable probablemente se debe solamente a la presencia de dos valores fuera de rango. En conclusión, PhtD fue el único antígeno que pudo proporcionar algo de protección contra las tres cepas en este modelo de colonización nasofaríngea.

Ejemplo 9

La inmunización con Phtd protege a los ratones contra colonización del pulmón con S. neumoniae

15 El modelo se adaptó a partir de Briles y col. J. Infect. Dis. 188; 339-348 (2003). Se inmunizaron ratones CBA/J hembra (cuatro semanas de edad; 30/grupo) por vía i.m. en el día 0, 14 y 28 con 3 µg de PhtD con adyuvante AS02. En el día 42, los ratones se expusieron por vía intranasal a 2×10^7 ufc/50 µl de *S. pneumoniae* 19F/2737. Los ratones de control se inyectaron con adyuvante solo. La carga bacteriana se midió mediante recuento de colonias en pulmones recolectados 3, 4 y 5 días después de la exposición. Todos los datos de los recuentos de colonias, después de la normalización, se compararon con ANOVA, seguido por la postprueba de Dunnett cuando el ANOVA se encontró significativa.

20 Los ratones CBA/J, una cepa susceptible a infecciones neumocócicas, se vacunaron con PhtD antes que éstos se desafien con una cepa bacteriana 19F moderadamente virulenta. Dicho protocolo permite la inducción de una neumonía focal sin sepsis generalizada. Después de la exposición, se evaluó el número de bacterias vivas en los pulmones en el día 3, 4 y 5.

25 Se demostró que la vacunación con PhtD reduce la carga bacteriana en los pulmones hasta un grado elevado (más del 95 %), en comparación con el placebo (Figura 15a). La eficacia de la vacunación con PhtD fue particularmente evidente cuando se analizó el número de ratones no colonizados, ya que hasta el 80 % de los ratones vacunados permaneció libre de bacterias en el día 5, en comparación con el 10 % en el grupo de control (Figura 15b).

Referencias

- 30 1. Adamou JE, Heinrichs JH, Erwin AL, y col. Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins that are protective against sepsis. *Infect. Immun.* 69(2), 949-958 (2001).
2. Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, y col. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99(22), 14434-14439 (2002).
- 35 3. Ancsin JB, Kisilevsky R. Laminin interactions important for basement membrane assembly are promoted by cinc and implicate laminin cinc finger-like sequences. *J. Biol. Chem.* 271(12), 6845-6851 (1996).
4. Bandyopadhyay K, Karmakar S, Ghosh A, Das PK. High affinity binding between laminin and laminin binding protein of *Leishmania* is stimulated by cinc and may involve laminin cinc-finger like sequences. *Eur. J. Biochem.* 269(6), 1622-1629 (2002).
- 40 5. Beghetto E, Gargano N, Ricci S, y col. Discovery of novel *Streptococcus pneumoniae* antigens by screening a whole-genome λ-display library. *FEMS Microbiol. Lett.* 262(1), 14-21 (2006).
6. Blom AM, Kask L, Ramesh B, Hillarp A. Effects of cinc on factor I cofactor activity of C4b-binding protein and factor H. *Arch. Biochem. Biophys.* 418(2), 108-118 (2003).
7. Brendel V, Trifonov EN. A computer algorithm for testing potential prokaryotic terminators. *Nucleic Acids Res.* 12(10), 4411-4427 (1984).
- 45 8. Brenot A, Weston BF, Caparon MG. A PerR-regulated metal transporter (PmtA) is an interface between oxidative stress and metal homeostasis in *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* 63(4), 1185-1196 (2007).
9. Bridy-Pappas AE, Margolis MB, Center KJ, Isaacman DJ. *Streptococcus pneumoniae*: description of the pathogen, disease epidemiology, treatment, and prevention. *Pharmacotherapy* 25(9), 1193-1212 (2005).
- 50 10. Bunker VW, Hinks LJ, Lawson MS, Clayton BE. Assessment of cinc and copper status of healthy elderly people using metabolic balance studies and measurement of leucocyte concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 40(5), 1096-1102 (1984).

11. Claverys J-P. A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res. Microbiol.* 152(3-4), 231-243 (2001).
12. Cockayne A, Hill PJ, Powell NBL, Bishop K, Sims C, Williams P. Molecular cloning of a 32-kilodalton lipoprotein component of a novel iron-regulated *Staphylococcus epidermidis* ABC transporter. *Infect. Immun.* 66(8), 3767-3774 (1998).
13. Dagan R, Engelhard D, Piccard E, Englehard D. Epidemiology of invasive childhood pneumococcal infections in Israel. The Israeli Pediatric Bacteremia and Meningitis Group. *JAMA* 268(23), 3328-3332 (1992).
14. Dagan R, Käyhty H, Wuorimaa T, y col. Tolerability and immunogenicity of an eleven valent mixed carrier *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-diphtheria toxoid or tetanus protein conjugate vaccine in Finnish and Israeli infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23(2), 91-98 (2004).
15. Dintilhac A, Alloing G, Granadel C, Claverys J-P. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol. Microbiol.* 25(4), 727-739 (1997a).
16. Dintilhac A, Claverys J-P. The adc locus, which affects competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, encodes an ABC transporter with a putative lipoprotein homologous to a family of streptococcal adhesins. *Res. Microbiol.* 148(2), 119-131 (1997b).
17. Elsner A, Kreikemeyer B, Braun-Kiewnick A, Spellerberg B, Buttaro BA, Podbielski A. Involvement of Lsp, a member of the Lral-lipoprotein family in *Streptococcus pyogenes*, in eukaryotic cell adhesion and internalization. *Infect. Immun.* 70(9), 4859-4869 (2002).
18. Fedson DC and Musher DM. Pneumococcal polysaccharide vaccines. En: *Vaccines*, editado por Plotkin SA and Orenstein WA, Philadelphia, PA:Elsevier, Inc, 2004, p. 529-588.
19. Ferretti JJ, McShan WM, Ajdic D, y col. Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98(8), 4658-4663 (2001).
20. Gagnon G, Vadeboncoeur C, Levesque RC, Frenette M. Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of the ptsI gene encoding enzyme I of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase transport system from *Streptococcus salivarius*. *Gene* 121(1), 71-78 (1992).
21. Hamel J, Charland N, Pineau I, y col. Prevention of pneumococcal disease in mice immunized with conserved surface-accessible proteins. *Infect. Immun.* 72(5), 2659-2670 (2004).
22. Hanahan D. Plasmid transformation by Simanis. En: *DNA cloning*, editado por Glover DM, London:IRL Press, 1985, p. 109-135.
23. Harlyk C, Mccourt J, Bordin G, Rodriguez AR, van der Eeckhout A. Determination of copper, zinc and iron in broncho-alveolar lavages by atomic absorption spectroscopy. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 11(3), 137-142 (1997).
24. Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect. Dis.* 5(2), 83-93 (2005).
25. Hava DL, Camilli A. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol. Microbiol.* 45(5), 1389-1405 (2002).
26. Hoskins J, Alborn WE, Jr., Arnold J, y col. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.* 183(19), 5709-5717 (2001).
27. Hostetter MK. Opsonic and nonopsonic interactions of C3 with *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* 5(2), 85-89 (1999).
28. Jenkinson HF. Cell surface protein receptors in oral streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 121(2), 133-140 (1994).
29. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, y col. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390(6657), 249-256 (1997).
30. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685 (1970).
31. Loisel E, Jacquamet L, Serre L, y col. AdcAll, a new pneumococcal Zn-binding protein homologous with ABC transporters: biochemical and structural analysis. *J. Mol. Biol.* 381(3), 594-606 (2008).
32. Lynch JP, III, Zhanel GG. Escalation of antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae*:

- implications for therapy. *Semin. Respir. Crit Care Med.* 26(6), 575-616 (2005).
33. Mbelle N, Huebner RE, Wasas AD, Kimura A, Chang I, Klugman KP. Immunogenicity and impact on nasopharyngeal carriage of a nonavalent pneumococcal conjugate vaccine. *J. Infect. Dis.* 180(4), 1171-1176 (1999).
- 5 34. McCullers JA, Tuomanen EI. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front Biosci.* 6, D877-D889 (2001).
35. Morrison DA, Jaurin B. *Streptococcus pneumoniae* possesses canonical *Escherichia coli* (sigma 70) promoters. *Mol. Microbiol.* 4(7), 1143-1152 (1990).
- 10 36. Nunes S, Sá-Leão R, Pereira LC, de Lencastre H. Emergence of a serotype 1 *Streptococcus pneumoniae* lineage colonising healthy children in Portugal in the seven-valent conjugate vaccination era. *Clin. Microbiol. Infect.* 14(1), 82-84 (2008).
37. Ogunniyi AD, Grabowicz M, Briles DE, Cook J, Paton JC. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 75(1), 350-357 (2007).
- 15 38. Ogunniyi AD, Grabowicz M, Mahdi LK, y col. Pneumococcal histidine triad proteins are regulated by the Zn²⁺-dependent repressor AdcR and inhibit complement deposition through the recruitment of complement factor H. *FASEB J.* 23(3), 731-738 (2009).
39. Panina EM, Mironov AA, Gelfand MS. Comparative genomics of bacterial cinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100(17), 9912-9917 (2003).
- 20 40. Papp-Wallace KM, Maguire ME. Manganese transport and the role of manganese in virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 60, 187-209 (2006).
41. Peterson JD, Umayam LA, Dickinson T, Hickey EK, White O. The Comprehensive Microbial Resource. *Nucleic Acids Res.* 29(1), 123-125 (2001).
- 25 42. Ransinghe C, Hobbs AA. A simple method to obtain the 5' ends of mRNA sequences by direct ligation of cDNA-RNA hybrids to a plasmid vector. *Technical Tips Online* 3(1), 128-132 (1998).
43. Riboldi-Tunncliffe A, Isaacs NW, Mitchell TJ. 1.2 Å crystal structure of the *S. pneumoniae* PhtA histidine triad domain a novel cinc binding fold. *FEBS Lett.* 579(24), 5353-5360 (2005).
- 30 44. Rosenberg M, Court D. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13, 319-353 (1979).
45. SICARD AM. A new synthetic medium for *Diplococcus pneumoniae*, and its use for the study of reciprocal transformation at the *amiA* locus. *Genetics* 50, 31-44 (1964).
46. Singleton RJ, Hennessy TW, Bulkow LR, y col. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. *JAMA* 297(16), 1784-1792 (2007).
- 35 47. Smart LE, Dougall AJ, Girdwood RWA. New 23-valent pneumococcal vaccine in relation to pneumococcal serotypes in systemic and non-systemic disease. *J. Infect.* 14(3), 209-215 (1987).
48. Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, y col. Lmb, a protein with similarities to the Lral adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect. Immun.* 67(2), 871-878 (1999).
- 40 49. Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, y col. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293(5529), 498-506 (2001).
50. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76(9), 4350-4354 (1979).
- 45 51. Turner DH, Sugimoto N, Freier SM. RNA structure prediction. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17, 167-192 (1988).
52. Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE, y col. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* 69(3), 1593-1598 (2001).

53. Yamamoto H, Uchiyama S, Nugroho FA, Sekiguchi J. A 23.4 kb segment at the 69°-70° region of the *Bacillus subtilis* genome. *Microbiology* 143 (Pt 4), 1317-1320 (1997).

54. Zhang Y, Masi AW, Barniak V, Mountzouros K, Hostetter MK, Green BA. Recombinant PhpA protein, a unique histidine motif-containing protein from *Streptococcus pneumoniae*, protects mice against intranasal pneumococcal challenge. *Infect. Immun.* 69(6), 3827-3836 (2001).

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína PhtX aislada para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección por *Streptococcus pneumoniae*, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en la sangre, pulmón, un compartimiento del oído o en las meninges de un paciente humano en un entorno en el cual la concentración libre de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} es suficientemente baja como para regular de forma positiva la expresión de al menos una proteína PhtX en el *Streptococcus pneumoniae* y en la que el paciente humano tiene niveles disminuidos de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} , según se mide mediante lavado bronquial y/o análisis de sangre.
- 10 2. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína PhtX se selecciona del grupo que consiste en PhtA, PhtB, PhtD y PhtE.
3. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la proteína PhtX es PhtD.
4. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en sangre y la concentración libre de Zn^{2+} en la sangre es menor de 10 nM, 1 nM, 100 pM o 10 pM según se mide en suero sanguíneo.
- 15 5. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en sangre y la concentración libre de Mn^{2+} en la sangre es menor de 10 nM, 1 nM, 100 pM o 10 pM según se mide en suero sanguíneo.
- 20 6. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en un pulmón y el tratamiento o la prevención reduce la carga bacteriana en los pulmones.
7. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en un pulmón y la concentración de Zn^{2+} en el tejido pulmonar es menor de 300, 200, 100, 50 o 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, según se mide mediante un lavado bronquial.
- 25 8. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en un pulmón y la concentración de Mn^{2+} en el tejido pulmonar es menor de 300, 200, 100, 50 o 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, según se mide mediante un lavado bronquial.
9. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en el oído medio y la concentración de Zn^{2+} en el oído medio es menor de 300, 200, 150, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2 o 0,1 μM .
- 30 10. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en el oído medio y la concentración de Mn^{2+} en el oído medio es menor de 300, 200, 150, 100, 50, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2 o 0,1 μM .
- 35 11. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en las meninges y la concentración de Zn^{2+} en el líquido cefalorraquídeo es menor de 1,5, 1, 0,75, 0,5, 0,25 o 0,1 μM o menor de 100, 75, 50, 25, o 10 $\mu\text{g}/\text{l}$.
12. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 u 11, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en las meninges y la concentración de Mn^{2+} en el líquido cefalorraquídeo es menor de 2,5, 2, 1,5, 1 o 0,5 $\mu\text{g}/\text{l}$ o menor de 50, 25, 10 o 5 nM.
- 40 13. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el paciente humano tiene múltiples infecciones bacterianas.
14. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el paciente humano tiene una infección bacteriana crónica.
15. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el paciente humano tiene menor Zn^{2+} y/o Mn^{2+} debido a una infección previa con una cepa bacteriana.
- 45 16. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que el paciente humano es susceptible a la infección por *Streptococcus pneumoniae*.

17. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* es septicemia, bacteremia, meningitis, otitis media o neumonía.

5 18. Uso de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una proteína PhtX aislada en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una infección por *Streptococcus pneumoniae*, en la que la infección por *Streptococcus pneumoniae* se produce en la sangre, pulmón, un compartimiento del oído o en las meninges de un paciente humano, en un entorno en el cual la concentración de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} es suficientemente baja como para regular de forma positiva la expresión de al menos una proteína PhtX en el *Streptococcus pneumoniae* y en la que el paciente humano tiene niveles disminuidos de Zn^{2+} y/o Mn^{2+} , según se mide mediante lavado bronquial y/o análisis de sangre.

10

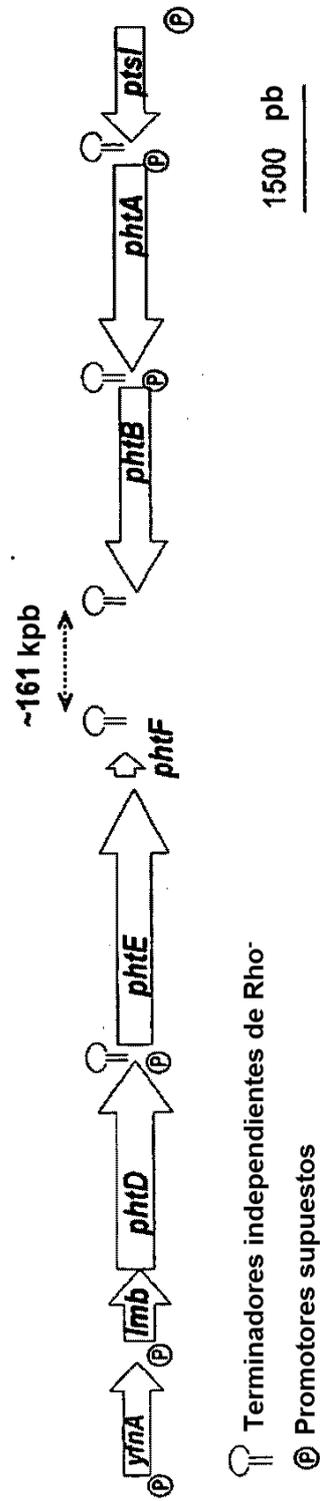


Figura 1.

VB64153

- (a)
- 5131 TCTTTT TAGAAAACGTAACAGAAACTTGACA⁻³⁵AAAAGTAAATTTAAATAGTAAAC⁻¹⁰ATTT
 5191 ACTGGTAAATTAATGGTTAAATAACCGGTTTAGAAAAC⁺¹TATTAATAAAGTAAAGAAAG
 5251 TTCAGAAAACCTTCATCATTTTATTGAARTGAGGG^{xbs}ATTATGAAATTTAGTAAAAAATAT^{phcE}
- (b)
- 2341 AAAAATCTTTGACA⁻³⁵AGTTGGATAATTTAGGAGTAAAC⁻¹⁰TATAACCAAGTTAAAGTAAATAGAGAG⁺¹
 2401 GAGTTTCTGCAATTTAGRAATGAAATGCAACTAGAAATATCAAATAGAAAGAGAG^{xbs}ATTTTCG
 2461 ATGAAAATTAATAGAAAACCTTGGTTCTGGCCAGC^{phcA}TTTTT
- (c)
- 4969 TTCTTGACA⁻³⁵AGCAATATAAAAARGAGTAAAC⁻¹⁰TATTAAC⁺¹TGTTAAATTAACCGGTTTATTA
 5029 CTTTATAGTGAATCAAATATACTTAAGAAAAGAGGG^{xbs}AAAGAAATGAATTAATAAATA^{phcB}
- (d)
- 1561 CTA AAAAATATCTTGACA⁻³⁵CAGATTAATTTTCAGGAGTAA⁻¹⁰TATTTACTAGTTAATTAAGA⁺¹
 1621 GTTAAAGGAG^{xbs}TTGGTTTCATGAAAGAAACA^{lmb}ATTTTATTGTCCTGTTAA
- (e)
- 1 GTTACGGTAGT⁻³⁵CAGATTTT TTAGAAAACA⁻¹⁰TTTTATAAATATTCACATATCTCCTATAT⁺¹
 61 TTATGGTAAATAAGAAATATCAGTTTATTTTGGAGTCAAAGATGAATATATTTTAGRACAA^{xbs}

Figura 2.

Fig. 2

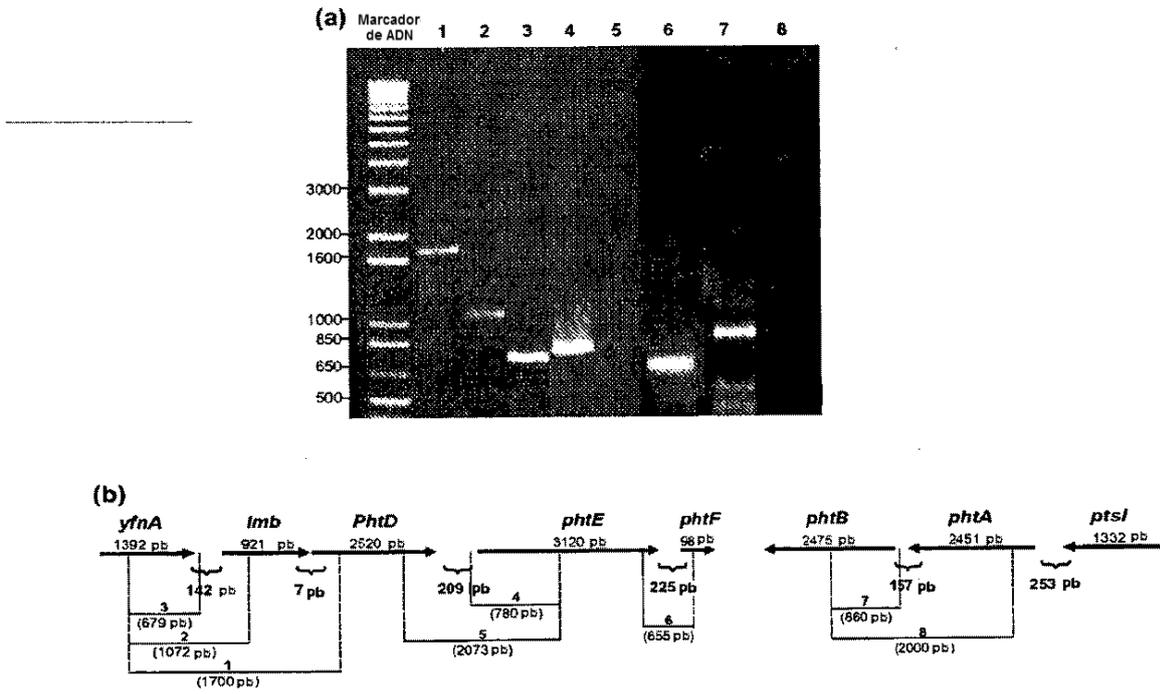


Fig. 4

Figura 4.

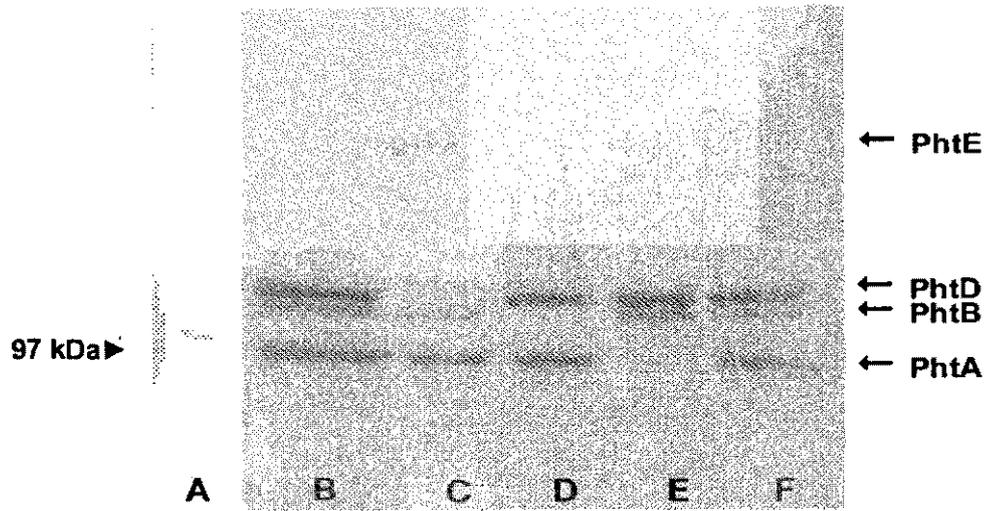


Figura 5.

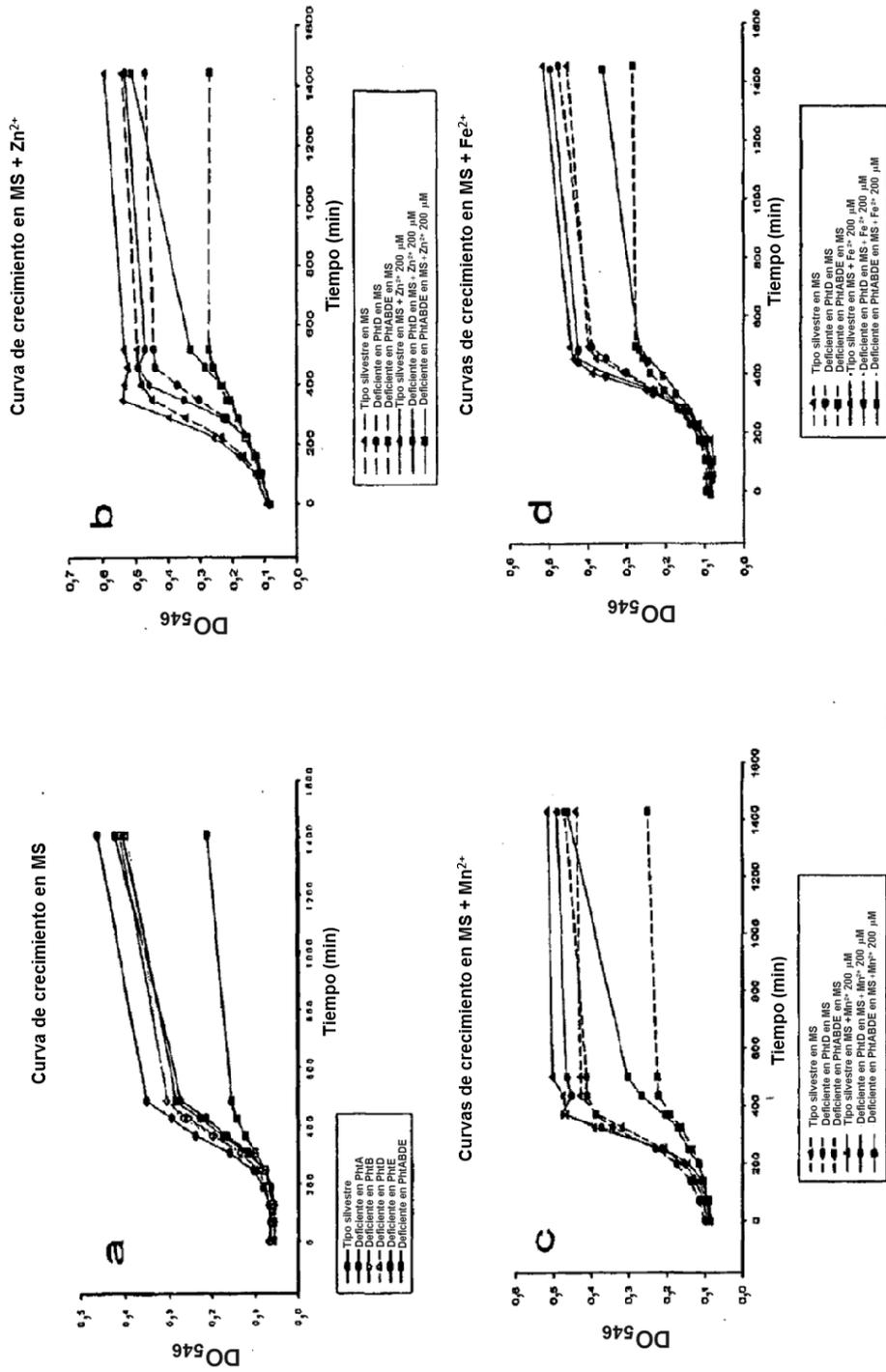


Figura 6.

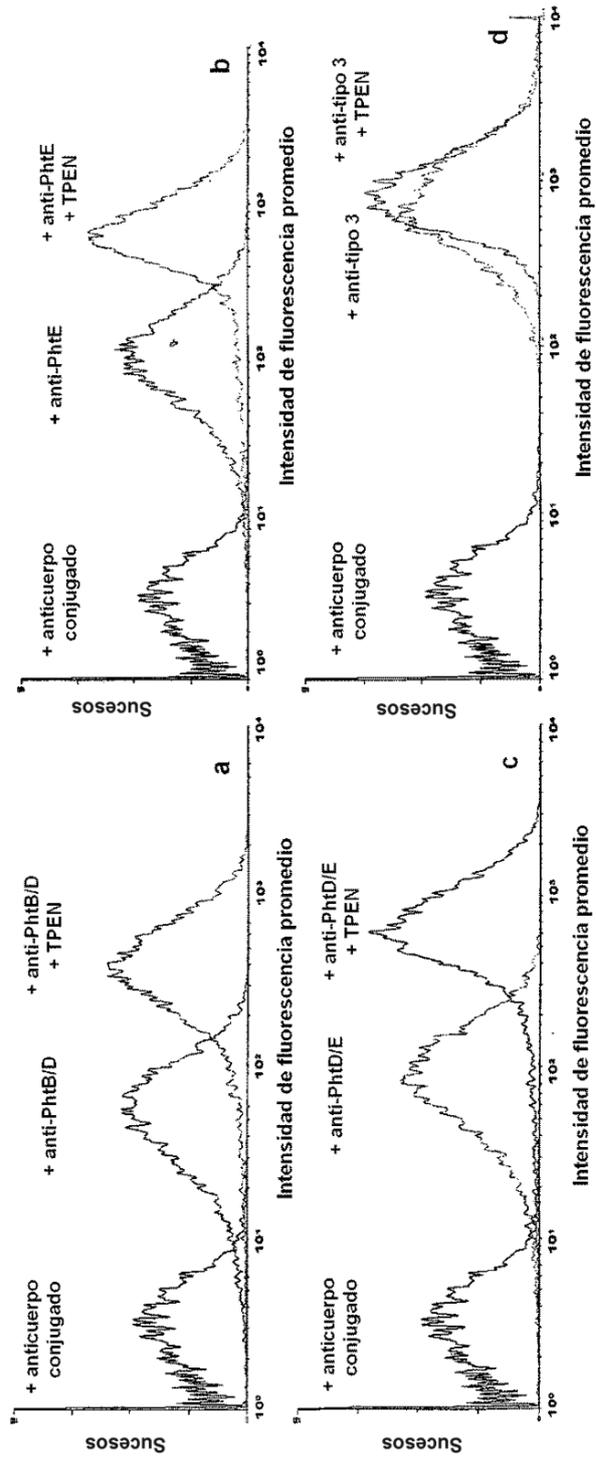


Figura 7.

Fig. 8

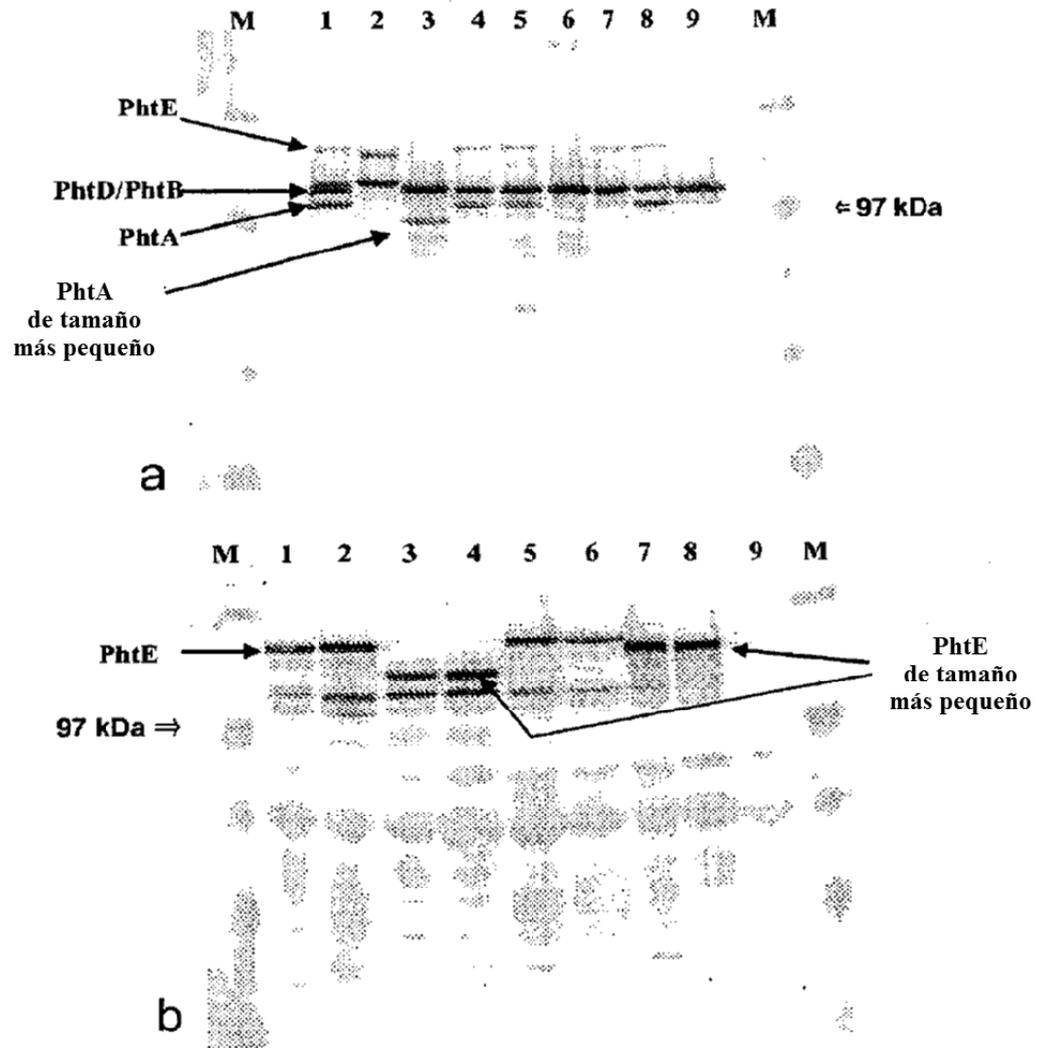


Figura 8.

	Número de secuencia analizada	Secuencia señal
Secuencia señal de PhtA	7	L V - A A I
Secuencia señal de PhtB	8	L A - V T/V V
Secuencia señal de PhtD	72	L V A - V V A
Secuencia señal de PhtE	8	F S I A G A V I V S S L

Figura 9.

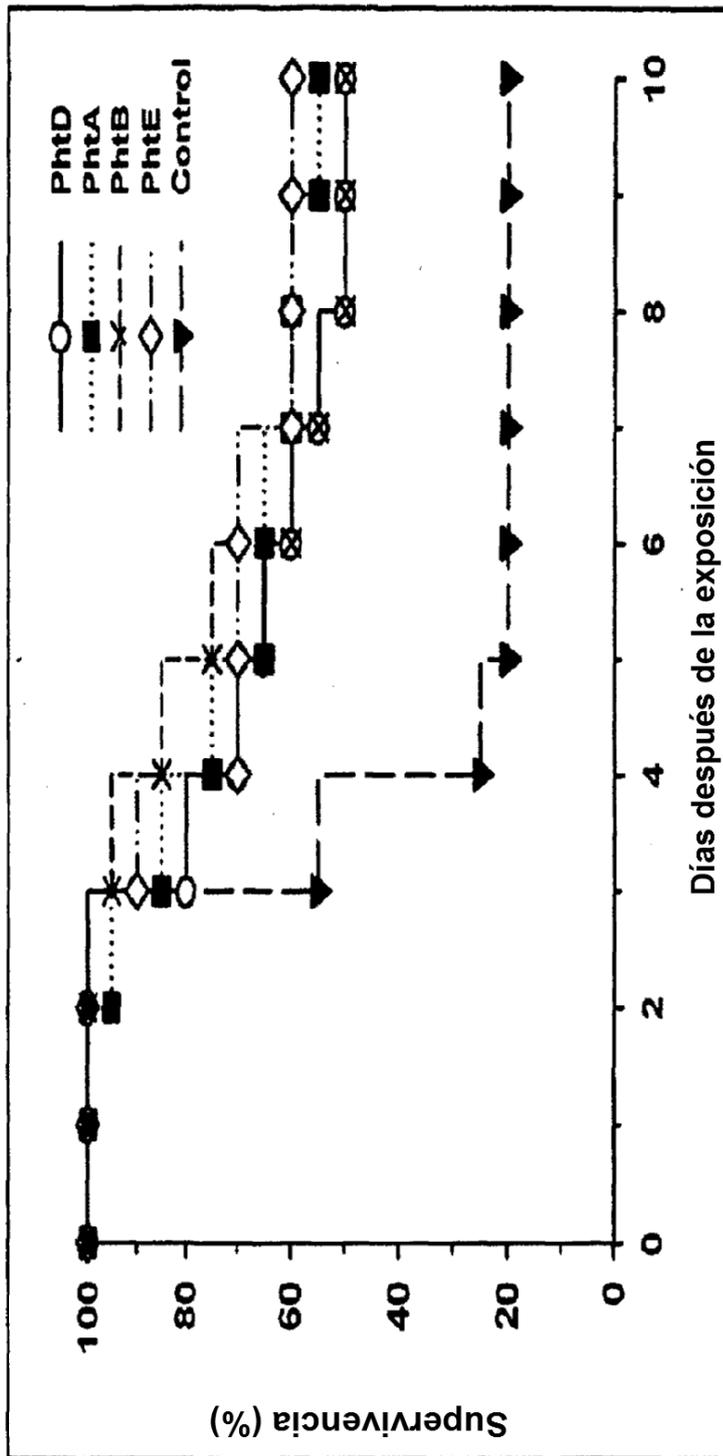


Figura 10.

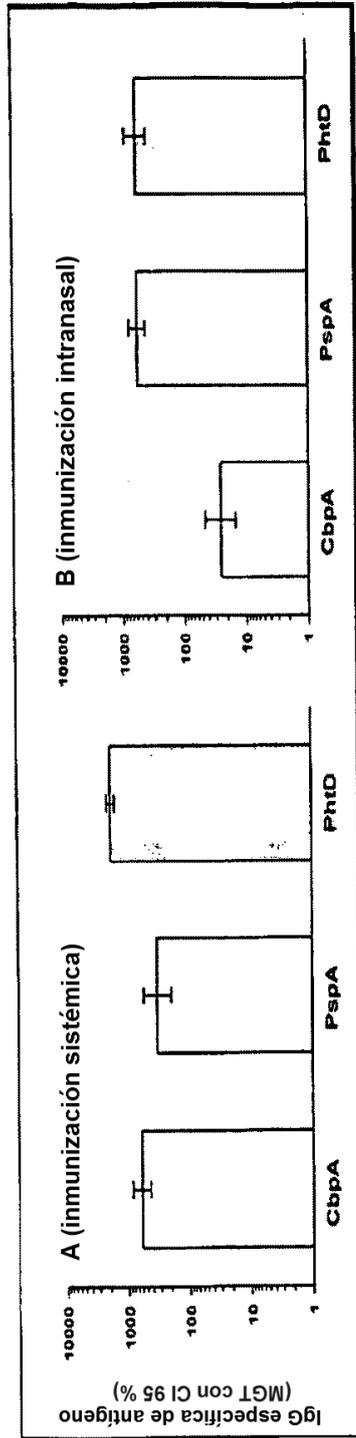


Figura 11

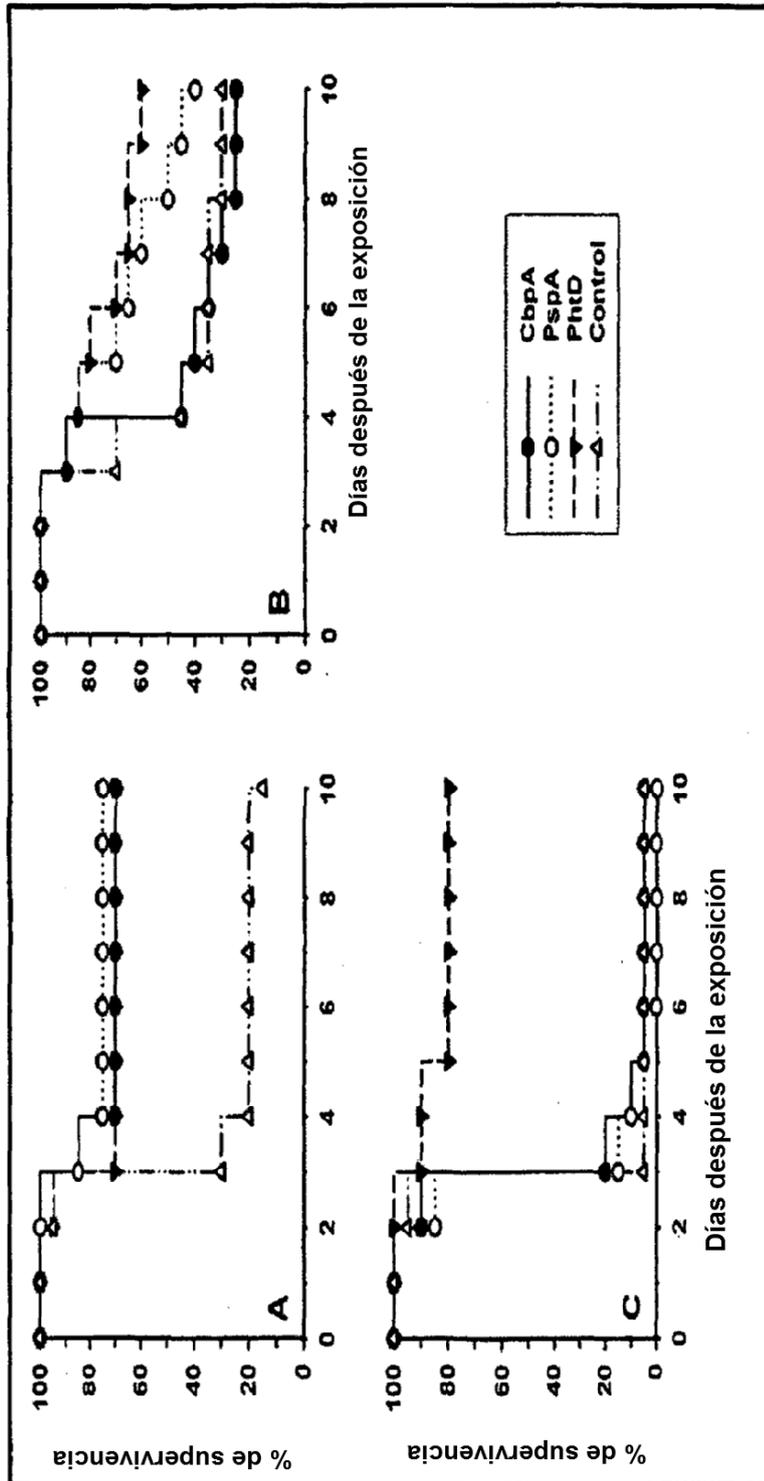


Figura 12

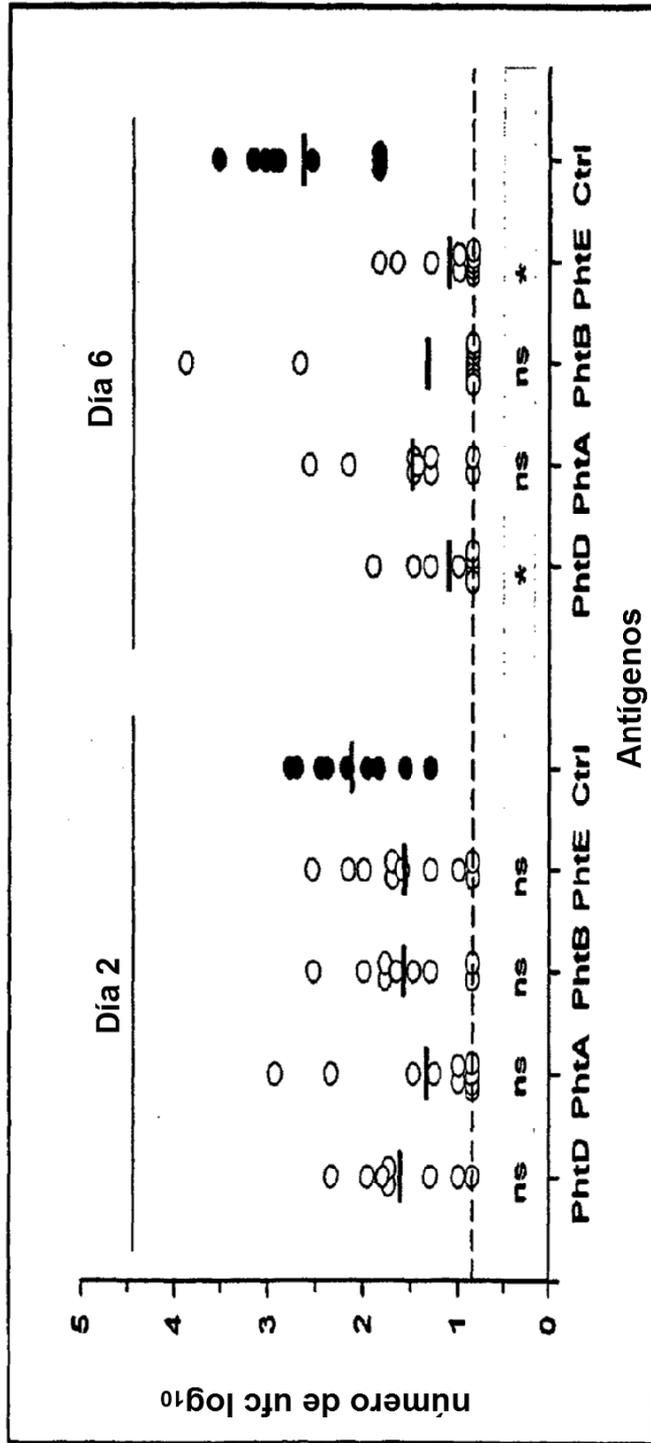


Figura 13

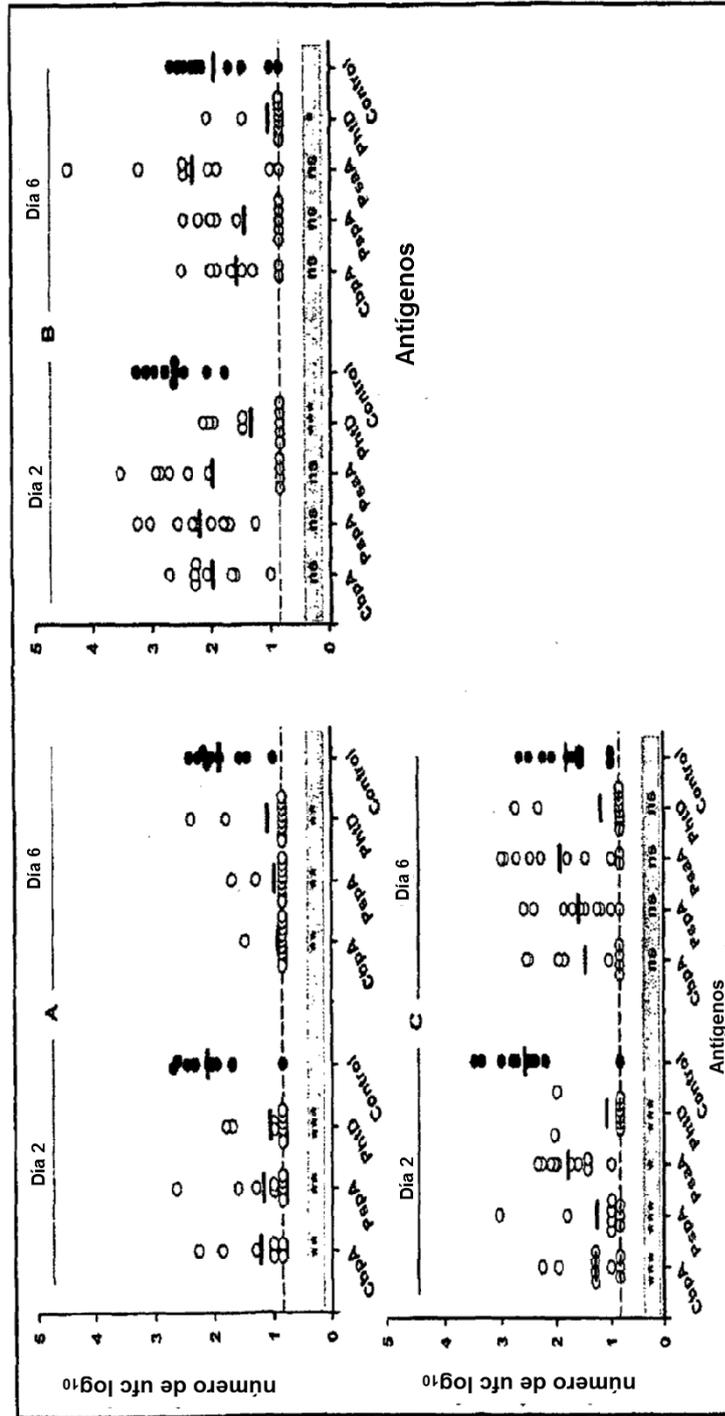


Figura 14

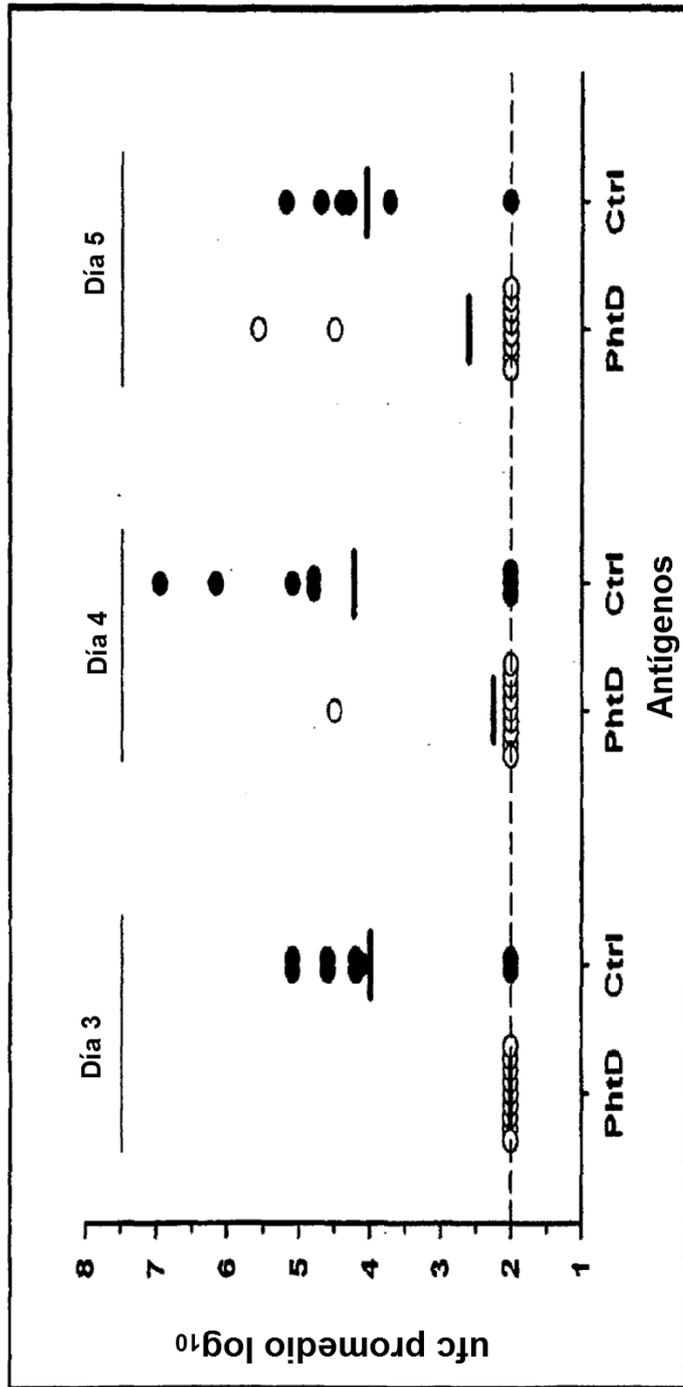


Figura 15