

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 957**

51 Int. Cl.:

A61K 39/09 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.08.2008 E 12197549 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2572726**

54 Título: **Composiciones que comprenden antígenos neumocócicos**

30 Prioridad:

01.08.2007 GB 0714963
29.08.2007 US 966866 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.08.2016

73 Titular/es:

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
Rue de l'Institut 89
1330 Rixensart, BE

72 Inventor/es:

DONATI, CLAUDIO;
MUZZI, ALESSANDRO;
MASIGNANI, VEGA;
BAGNOLI, FABIO;
RUGGIERO, PAOLO y
BARROCHI, MICHÉLE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 580 957 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones que comprenden antígenos neumocócicos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a antígenos derivados de *S. pneumoniae* y su uso en inmunización, como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la técnica

10 *Streptococcus pneumoniae*, también conocido como neumococo, es una bacteria Gram-positiva esférica. Es la causa más común de meningitis bacteriana aguda en adultos y en niños mayores de 5 años de edad. Algunas vacunas neumocócicas actuales se basan en sacáridos capsulares. La única vacuna pediátrica es PREVNAR™, que es una mezcla de sacáridos conjugados a partir de 7 serotipos diferentes. También está disponible una vacuna para adultos basada en una mezcla de sacáridos conjugados de 23 serotipos diferentes. Ambas vacunas son difíciles de fabricar y, sin embargo, hay más de 90 serotipos de neumococo en total. Por lo tanto sigue existiendo una necesidad de identificar más y mejores antígenos para su uso en vacunas neumocócicas.

15 La referencia 10 desvela la identificación de antígenos reactivos a suero hiperinmune de *S. pneumoniae* útiles para vacunación.

Divulgación de la invención

La invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de antígenos de *S. pneumoniae*, comprendiendo dicha combinación un antígeno spr0096 y un antígeno spr2021, en la que:

dicho antígeno spr0096 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos:

20 (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 12; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 12; y

dicho antígeno spr2021 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos:

(a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 11; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 11.

25 La invención también proporciona un polipéptido de fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}\{-\text{X-L}\}_n\text{-B-COOH}$, en el que:

X es una secuencia de aminoácidos de un antígeno neumocócico, seleccionado entre el grupo que consiste en: (1) un antígeno spr0057; (2) un antígeno spr0096; (3) un antígeno spr0565; y (4) un antígeno spr2021; (5) un antígeno RrgA; y (6) un antígeno RrgB;

30 L es una secuencia de aminoácidos de engarce adicional;

A es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional; B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional, n es un número entero de 2 o más; y

al menos un ejemplo de X es spr0096 y al menos un ejemplo de X es spr2021; en la que:

35 dicho antígeno spr0057 comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 1; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 1;

dicho antígeno spr0096 comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 12; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 12;

40 dicho antígeno spr0565 comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 3; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 3;

dicho antígeno spr2021 comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 11; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 11;

45 dicho antígeno RrgA comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 172 o 179; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 172 o 179; y/o

50 dicho antígeno RrgB comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 173, 174 o 175; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 173, 174, o 175.

La invención también proporciona un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de un 75 % o superior con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 194 y 205.

Al igual que las referencias 1 y 2, los presentes inventores creen que una vacuna de *S. pneumoniae* eficaz puede requerir varios componentes antigénicos, y por lo tanto han identificado diversas combinaciones de polipéptidos neumocócicos para uso en inmunización. Los inventores también han identificado algunas polipéptidos neumocócicos que pueden ser útiles como antígenos individuales. Estos polipéptidos se pueden usar opcionalmente en combinación con sacáridos neumocócicos u otros polipéptidos neumocócicos. Los antígenos se pueden usar en vacunas neumocócicas, pero también se pueden usar como componentes en vacunas para inmunización con respecto a múltiples patógenos.

Los inventores han identificado los siguientes 7 polipéptidos neumocócicos: spr0057; spr0286; spr0565; spr1098; spr1345; spr1416; spr1418. En el presente documento este conjunto de antígenos se denomina 'el primer grupo de antígenos'. Por lo tanto, la divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de antígenos de *S. pneumoniae*, comprendiendo dicha combinación dos o más (es decir, 2, 3, 4, 5, 6 o los 7) antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en: (1) un antígeno spr0057; (2) un antígeno spr0286; (3) un antígeno spr0565; (4) un antígeno spr1098; (5) un antígeno spr1345; (6) un antígeno spr1416; y/o (7) un antígeno spr1418.

Los inventores han identificado los siguientes 4 polipéptidos neumocócicos: spr0867; spr1431; spr1739; spr2021. En el presente documento este conjunto de antígenos se denomina 'el segundo grupo de antígenos'. Por lo tanto, la divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de antígenos de *S. pneumoniae*, comprendiendo dicha combinación dos o más (es decir, 2, 3 o los 4) antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en: (1) un antígeno spr0867; (2) un antígeno spr1431; (3) un antígeno spr1739; y/o (4) un antígeno spr2021

Los inventores han identificado los siguientes 3 polipéptidos neumocócicos: spr0096; spr1433; spr1707. En el presente documento este conjunto de antígenos se denomina 'el tercer grupo de antígenos'. Por lo tanto, la divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de antígenos de *S. pneumoniae*, comprendiendo dicha combinación dos o tres antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en: (1) un antígeno spr0096; (2) un antígeno spr1433; y/o (3) un antígeno spr1707.

La combinación de 11 polipéptidos neumocócicos en el primer y segundo grupos de antígenos en el presente documento se denomina 'el cuarto grupo de antígenos'. Por lo tanto, la divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de antígenos de *S. pneumoniae*, comprendiendo dicha combinación dos o más (es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o los 11) antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en: (1) un antígeno spr0057; (2) un antígeno spr0286; (3) un antígeno spr0565; (4) un antígeno spr1098; (5) un antígeno spr1345; (6) un antígeno spr1416; (7) un antígeno spr1418; (8) un antígeno spr0867; (9) un antígeno spr1431; (10) un antígeno spr1739; y/o (11) un antígeno spr2021.

La combinación de 10 polipéptidos neumocócicos en el primer y tercer grupos de antígenos en el presente documento se denomina 'el quinto grupo de antígenos'. Por lo tanto, la divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de antígenos de *S. pneumoniae*, comprendiendo dicha combinación dos o más (es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o los 10) antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en: (1) un antígeno spr0057; (2) un antígeno spr0286; (3) un antígeno spr0565; (4) un antígeno spr1098; (5) un antígeno spr1345; (6) un antígeno spr1416; (7) un antígeno spr1418; (8) un antígeno spr0096; (9) un antígeno spr1433; y/o (10) un antígeno spr1707.

La combinación de 7 polipéptidos neumocócicos en el segundo y tercer grupos de antígenos en el presente documento se denomina 'el sexto grupo de antígenos'. Por lo tanto, la divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de antígenos de *S. pneumoniae*, comprendiendo dicha combinación dos o más (es decir, 2, 3, 4, 5, 6, o los 7) antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en: (1) un antígeno spr0867; (2) un antígeno spr1431; (3) un antígeno spr1739; (4) un antígeno spr2021; (5) un antígeno spr0096; (6) un antígeno spr1433; y/o (7) un antígeno spr1707.

La combinación de 14 polipéptidos neumocócicos en el primer, segundo y tercer grupos de antígenos en el presente documento se denomina 'el séptimo grupo de antígenos'. Por lo tanto, la divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de antígenos de *S. pneumoniae*, comprendiendo dicha combinación dos o más (es decir, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o los 14) antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en: (1) un antígeno spr0057; (2) un antígeno spr0286; (3) un antígeno spr0565; (4) un antígeno spr1098; (5) un antígeno spr1345; (6) un antígeno spr1416; (7) un antígeno spr1418; (8) un antígeno spr0867; (9) un antígeno spr1431; (10) un antígeno spr1739; (11) un antígeno spr2021; (12) un antígeno spr0096; (13) un antígeno spr1433; y/o (14) un antígeno spr1707.

Dentro del séptimo grupo de antígenos, un subconjunto preferente de cuatro antígenos es el 'octavo grupo de antígenos', que incluye un antígeno de cada uno del primero, segundo y tercer grupos, en particular spr0057, spr0096, spr0565 y spr2021. Por lo tanto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende

5 una combinación de antígenos de *S. pneumoniae*, comprendiendo dicha combinación dos o más (es decir, 2, 3 o los 4) antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en: (1) un antígeno spr0057; (2) un antígeno spr0096; (3) un antígeno spr0565; y/o (4) un antígeno spr2021, como se definen las reivindicaciones. Dentro de este octavo grupo, la composición puede comprender: (1), (2) y (3); (1), (2) y (4); (1), (3) y (4); (2), (3) y (4); o (1), (2), (3) y (4). La expresión de estos cuatro antígenos se ha confirmado de forma inmunológica a través de un panel de 32 cepas neumocócicas con diversos serotipos.

10 El 'noveno grupo de antígenos' es el octavo grupo de antígenos más un antígeno de pilus de RrgB. Por lo tanto, la invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de antígenos de *S. pneumoniae*, comprendiendo dicha combinación uno o más antígeno(s) de pilus de RrgB y dos o más (es decir, 2, 3 o los 4) antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en: (1) un antígeno spr0057; (2) un antígeno spr0096; (3) un antígeno spr0565; y/o (4) un antígeno spr2021, como se define en las reivindicaciones.

15 El 'décimo grupo de antígenos' es el octavo grupo de antígenos más un polipéptido Pmp. Por lo tanto, la invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de antígenos de *S. pneumoniae*, comprendiendo dicha combinación dos o más (es decir, 2, 3, 4 o los 5) antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en: (1) un antígeno spr0057; (2) un antígeno spr0096; (3) un antígeno spr0565; (4) un antígeno spr2021; y/o (5) un polipéptido Pmp, como se define en las reivindicaciones.

20 Algunas combinaciones específicas de interés comprenden: (i) un antígeno spr0057 y un antígeno spr0096; (ii) un antígeno spr0057 y un antígeno spr2021; (iii) un antígeno spr0057, un antígeno spr0096 y un antígeno spr2021; (iv) un antígeno spr0057 y un antígeno spr0565; (v) un antígeno spr0565 y un antígeno spr2021; (vi) un antígeno spr0057, un antígeno spr0565 y un antígeno spr2021; (vii) un antígeno spr0565, un antígeno spr2021 y un antígeno spr1739 por ejemplo detoxificado; y (viii) un antígeno spr0565, un antígeno spr2021 y un polipéptido Pmp, como se define en las reivindicaciones.

La invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende dos o más exoglicosidasas neumocócicas diferentes, como se define en las reivindicaciones.

25 La invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende al menos una exoglicosidasa neumocócica y al menos una peptidoglicano hidrolasa neumocócica, como se define en las reivindicaciones.

La invención también proporciona una composición inmunogénica que comprende dos o más peptidoglicano hidrolasas diferentes, como se define en las reivindicaciones.

30 Algunas combinaciones ventajosas de la invención son aquéllas en las que dos o más antígenos actúan de forma sinérgica. Por lo tanto, la protección frente a la enfermedad neumocócica conseguida por su administración combinada supera lo esperado por simple adición de su eficacia protectora individual.

Antígenos de polipéptidos adicionales

35 Además de antígenos de los diversos grupos de antígenos de la invención, algunas composiciones inmunogénicas, como se define en las reivindicaciones, pueden incluir uno o más de los siguientes polipéptidos para aumentar la respuesta inmune anti-neumocócica provocada por la composición:

- Una o más subunidades de un pilus neumocócico, tal como RrgA, RrgB y/o RrgC.
- Un polipéptido ClpP.
- Un polipéptido LytA.
- Un polipéptido CPL1.
- 40 • Un polipéptido PhtA.
- Un polipéptido PhtB.
- Un polipéptido PhtD.
- Un polipéptido PhtE.
- Un polipéptido CbpD
- 45 • Un polipéptido CbpG
- Un polipéptido PvaA.
- Un polipéptido Hic.
- Un polipéptido Pmp.

- Un polipéptido ZmpB.
- Un polipéptido PspA
- Un polipéptido PsaA
- Un polipéptido PspC.
- 5 • Un polipéptido PrtA.
- Un polipéptido Sp91.
- Un polipéptido Sp133.
- Un polipéptido PiuA y/o un polipéptido PiaA.
- Un polipéptido spr0222.
- 10 • Un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en: IC1; IC2; IC3; IC4; IC5; IC6; IC7; IC8; IC9; IC10; IC11; IC12; IC13; IC14; IC15; IC16; IC17; IC18; IC19; IC20; IC21; IC22; IC23; IC24; IC25; IC26; IC27; IC28; IC29; IC30; IC31; IC32; IC33; IC34; IC35; IC36; IC37; IC38; IC39; IC40; IC41; IC42; IC43; IC44; IC45; IC46; IC47; IC48; IC49; IC50; IC51; IC52; IC53; IC54; IC55; IC56; IC57; IC58; IC59; IC60; IC61; IC62; IC63; IC64; IC65; IC66; IC67; IC68; IC69; IC70; IC71; IC72; IC73; IC74; IC75; IC76; IC77; IC78; IC79; IC80; IC81; IC82; IC83; IC84; IC85; IC86; IC88; IC89; IC90; IC91; IC92; IC93; IC94; IC95; IC96; IC97; IC98; IC99; IC100; IC101; IC102; IC103; IC104; IC105; IC106; IC107; IC108; IC109; IC110; IC111; IC112; IC113; IC114; IC115; IC116; IC117; IC118; IC119; IC120; IC121; IC122; IC123; IC124; IC125; IC126; IC127; IC128; IC129; IC130; e IC131.

Un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en: ID-204, ID-212, ID-213, ID-214, ID-215, ID-ID-216, ID-217, ID-219, ID-220, ID-225, ID-301, ID-302, ID-303, ID-304, ID-305, ID-306, como se desvela en la referencia 3.

- 20 • Un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en: Sit1A, Sit1B, Sit1C, Sit2B, Sit2C, Sit2D, Sit3A, Sit3B, Sit3C, Sit3D, ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6, ORF6, ORF7, ORF8, ORF9, ORF10, ORF11, ORF12, ORF13, ORF14, MS1, MS2, MS3, MS4, MS5, MS6, MS7, MS8, MS9, MS10 o MS11, como se desvela en la referencia 4.
- Un antígeno desvelado en la referencia 5.
- 25 • Un antígeno desvelado en las Tablas 1-3 de la referencia 6, tal como CbiO.
- Un antígeno desvelado en la referencia 7, tal como la proteína S8 de la subunidad ribosómica 30S.
- un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en: una fosfoenolpiruvato proteína fosfotransferasa; una fosfomanomutasa; un factor de desencadenamiento; un factor G de elongación; una proteína de resistencia a tetraciclina (tetO); una cadena alfa de ARN polimerasa dirigida por ADN; una NADH oxidasa; una subunidad A de glutamil-ARNt amidotransferasa; un homólogo de proteína A de sustancia de uso de N; una Xaa-His dipeptidasa; una proteína ftsz de división celular; una cinc metaloproteína; una L-lactato deshidrogenasa; una gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH); una fructosa-bifosfato aldolasa; una UDP-glucosa 4-epimerasa; una proteína typA/BipA de unión a GTP, una GMP sintasa; una glutamil-ARNt sintetasa; una glutamato deshidrogenasa específica de NADP; un factor TS de elongación; una fosfoglicerato quinasa; una piridin nucleótido-disulfuro oxidoreductasa; una proteína S1 de la subunidad ribosómica 40S; una 6-fosfogluconato deshidrogenasa; una aminopeptidasa C; una carbomil-fosfato sintasa (subunidad grande); un componente de IIAB específico de manosa del sistema PTS; una proteína S2 ribosómica; una dihidroorotato deshidrogenasa; una aspartato carbamoiltransferasa; un factor Tu de elongación; una proteína A inmunogénica de la superficie neumocócica (PsipA); una fosfoglicerato quinasa; una proteína endopeptidasa O de unión al sustrato transportador de ABC; una proteína B inmunogénica de la superficie neumocócica (PsipB); o una proteína C inmunogénica de la superficie neumocócica (PsipC) [8].
- 30
- 35
- 40

Pili

Muchas cepas de *S. pneumoniae* poseen un pilus, codificado dentro de un islote de patogenicidad (*plrA*). El islote codifica tres proteínas de superficie (RrgA, RrgB, y RrgC) y tres enzimas sortasa. En algunas realizaciones de la invención, una composición, como se define en las reivindicaciones, incluirá uno o más de: RrgA; RrgB; RrgC; SrtB; SrtC; y/o SrtD. De estas seis proteínas, incluyendo una o más de RrgA, RrgB y/o RrgC es preferente. RrgB es la proteína del pilus más preferente a incluir.

Algunas cepas poseen un tipo de pilus diferente [9], 'PI-2'. El operón PI-2 codifica PitA, SipA, PitB, SrtG1, y SrtG2. En algunas realizaciones de la invención, una composición, como se define en las reivindicaciones, incluirá uno o más de: PitA, SipA, PitB, SrtG1, y/o SrtG2. IC1 a IC131

Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones de la invención, una composición, como se define en las reivindicaciones, incluirá uno o más antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en IC1 a IC131. Estos 131 polipéptidos se desvelan en la referencia 10, siendo los 144 polipéptidos de la Tabla 3 en la misma excepto los enumerados como SP0117, SP0641, SP0664, SP1003, SP1004, SP1174, SP1175, SP1573, SP1687, SP1693, SP1937 y SP2190. Dentro de los 132 polipéptidos IC1 a IC131, un subconjunto preferente a partir del que se puede seleccionar uno o más polipéptido(s) es: IC1; IC8; IC16; IC23; IC31; IC34; IC40; IC45; IC47; IC57; IC58; IC60; e IC69.

Combinaciones con conjugados neumocócicos

Los antígenos individuales identificados en los grupos de antígenos se pueden usar en combinación con conjugados neumocócicos. Por lo tanto la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de:

(1) uno o más antígeno(s) seleccionados entre el sexto, séptimo, octavo, noveno y décimo grupos de antígenos (como se ha definido anteriormente) y como se define en las reivindicaciones; y

(2) uno o más conjugados de un sacárido capsular neumocócico y una proteína vehículo.

Un conjugado usado en el componente (2) de esta combinación incluye un resto de sacárido y un resto de vehículo. El resto de sacárido es del sacárido capsular de un neumococo. El sacárido puede ser un polisacárido que tenga el tamaño que aparece durante la purificación del sacárido a partir de bacterias, o puede ser un oligosacárido conseguido por fragmentación de un polisacárido de este tipo. En el producto PREVNAR™ 7-valente, por ejemplo, 6 de los sacáridos están presentes como polisacáridos intactos mientras que uno (el serotipo 18C) está presente como un oligosacárido.

Una composición puede incluir un sacárido capsular de uno o más de los siguientes serotipos neumocócicos: 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y/o 33F. Una composición puede incluir múltiples serotipos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o más serotipos. En la técnica ya se conocen combinaciones de conjugados 7-valentes, 9-valentes, 10-valentes, 11-valentes y 13-valentes, al igual que una combinación sin conjugar 23-valente.

Por ejemplo, una combinación 10-valente puede incluir sacárido de los serotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Una combinación 11-valente puede incluir adicionalmente sacárido del serotipo 3. Una combinación 12-valente puede añadir a la mezcla 10-valente: los serotipos 6A y 19A; 6A y 22F; 19A y 22F; 6A y 15B; 19A y 15B; r 22F y 15B; una combinación 13-valente puede añadir a la mezcla 11-valente: los serotipos 19A y 22F; 8 y 12F; 8 y 15B; 8 y 19A; 8 y 22F; 12F y 15B; 12F y 19A; 12F y 22F; 15B y 19A; 15B y 22F. *etc.*

El resto de vehículo normalmente será una proteína, pero preferentemente no uno de los antígenos de (1). Algunas proteínas de vehículo habituales son toxinas bacterianas, tales como toxinas de difteria, o tétanos, o toxoides o mutantes de las mismas. El mutante de la toxina de difteria, CRM₁₉₇, [11] es útil, y es el vehículo en el producto PREVNAR™. Otras proteínas vehículo adecuadas incluyen el complejo de proteína de la membrana externa de *N. meningitidis* [12], péptidos sintéticos [13,14], proteínas de choque térmico [15,16], proteínas de pertussis [17,18], citoquinas [19], linfoquinas [19], hormonas [19], factores de crecimiento [19], proteínas artificiales que comprenden epítopos de linfocitos T CD4⁺ humanos múltiples de diversos antígenos derivados de patógeno [20] tales como N19 [21], proteína D de *H. influenzae* [22-24], neumolisina [25] o sus derivados no tóxicos [26], proteína PspA de superficie neumocócica [27], proteínas de absorción de hierro [28], toxina A o B de *C. difficile* [29], exoproteína A de *P. aeruginosa* recombinante (rEPA) [30], *etc.*

Cuando una composición incluye más de un conjugado, cada conjugado puede usar la misma proteína vehículo o una proteína vehículo diferente. La referencia 31 describe ventajas potenciales cuando se usan diferentes proteínas en vacunas de conjugados neumocócicos multivalente.

En algunas realizaciones, un solo conjugado puede portar sacáridos de múltiples serotipos [32]. Sin embargo, normalmente, cada conjugado incluirá sacáridos de un solo serotipo.

Los conjugados pueden tener un exceso de vehículo (p/p) o exceso de sacárido (p/p). En algunas realizaciones, un conjugado puede incluir esos iguales de cada uno.

La molécula de vehículo puede estar conjugada de forma conveniente con el vehículo directamente o a través de un engarce. Las uniones directas a la proteína se pueden conseguir, por ejemplo, mediante aminación reductora entre el sacárido y el vehículo, como se describe, por ejemplo, en las referencias 33 y 34. En primer lugar puede ser necesario activar el sacárido, por ejemplo, mediante oxidación. Se pueden fabricar algunas uniones a través de un grupo de engarce usando cualquier procedimiento conocido, por ejemplo, los procedimientos descritos en las referencias 35 y 36. Un tipo de unión preferente es un engarce de ácido adípico, que se puede formar mediante acoplamiento de un grupo -NH₂ libre (por ejemplo, introducido a un glucano mediante aminación) con ácido nítrico (usando, por ejemplo, activación de diimida), y a continuación mediante acoplamiento de una proteína al compuesto intermedio resultante de sacárido-ácido adípico [37,38]. Otro tipo de unión preferente es un engarce de carbonilo,

que se puede formar por reacción de un grupo hidroxilo libre de un sacárido CDI [39, 40] seguido de reacción con una proteína para formar una unión de carbamato. Otros engarces incluyen β -propionamido [41], nitrofenil-etilamina [42], haluros de haloacilo [43], uniones glucosídicas [44], ácido 6-aminocaproico [45], ADH [46], restos de C₄ a C₁₂ [47], etc. También se puede usar condensación de carbodiimida [48].

5 Los antígenos individuales identificados en los grupos de antígenos se pueden usar como proteínas portadoras para sacáridos capsulares neumocócicos, para formar un conjugado covalente. Por lo tanto, la divulgación proporciona una composición inmunogénica que comprende un conjugado de (1) un antígeno seleccionado entre el primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno o décimo grupos de antígenos y (2) un sacárido capsular neumocócico. Algunas características adicionales de un conjugado de este tipo se han descrito
10 anteriormente. El uso de proteínas neumocócicas como vehículos en conjugados se conoce bien en la técnica [por ejemplo, refs. 25, 27 y 67]. Estos conjugados se pueden combinar con cualquiera de los antígenos adicionales desvelados en el presente documento. Combinaciones con antígenos no neumocócicos

15 Los antígenos individuales identificados en los grupos de antígenos se pueden usar en combinación con antígenos no neumocócicos. Por lo tanto, la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una combinación de:

(1) uno o más antígeno(s) seleccionados entre el sexto, séptimo, octavo, noveno o décimo grupos de antígenos (como se ha definido anteriormente) y como se define en las reivindicaciones; y

20 (2) uno o más antígeno(s) seleccionados entre el grupo que consiste en: toxoide de difteria; toxoide del tétanos; antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; un antígeno del virus de la polio inactivado; uno o más antígenos de pertussis acelulares; un conjugado del antígeno de sacárido capsular de *Haemophilus influenzae* de tipo B; un conjugado del antígeno de sacárido capsular del serogrupo C de *Neisseria meningitidis*; un conjugado del antígeno de sacárido capsular del serogrupo Y de *Neisseria meningitidis*; un conjugado del antígeno de sacárido capsular del serogrupo W135 de *Neisseria meningitidis*; y un conjugado del antígeno de sacárido capsular del serogrupo A de *Neisseria meningitidis*.

25 El toxoide de difteria se puede obtener por tratamiento (por ejemplo, usando formaldehído) de la toxina de difteria de *Corynebacterium diphtheriae*. Algunos toxoides de difteria se desvelan con más detalle en el capítulo 13 de la referencia 49.

El toxoide del tétanos se puede obtener por tratamiento (por ejemplo, usando formaldehído) de la toxina del tétanos de *Clostridium tetani*. Algunos toxoides del tétanos se desvelan con más detalle en el capítulo 27 de la referencia 49.

30 El antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) es el componente principal de la cápside del virus de la hepatitis B. Se produce de forma conveniente mediante expresión recombinante en una levadura, tal como una *Saccharomyces cerevisiae*.

35 Los antígenos del virus de la polio inactivados se preparan a partir de virus que crecen en cultivo celular y a continuación se inactivan (por ejemplo, usando formaldehído). Dado que la poliomielitis puede estar causada por uno de los tres tipos de virus de la polio, como se explica en el capítulo 24 de la referencia 49, una composición puede incluir tres antígenos del virus de la polio: virus de la polio de Tipo 1 (por ejemplo, cepa Mahoney), virus de la polio de Tipo 2 (por ejemplo, cepa MEF-1), y virus de la polio de Tipo 3 (por ejemplo, cepa Saukett).

40 El antígeno(s) acelular de pertussis comprende antígenos de *B. pertussis* purificados específicos, ya sea purificados a partir de la bacteria nativa o purificados después de expresión en un hospedador recombinante. Es habitual el uso de más de un antígeno acelular, y de este modo, una composición puede incluir uno, dos o tres de los siguientes antígenos de *B. pertussis* bien conocidos y bien caracterizados: (1) toxina de pertussis detoxificada (toxidoide de pertussis, o 'PT'); (2) hemaglutinina filamentosa ('FHA'); (3) pertactina (también conocida como 'proteína de membrana externa de 69 kiloDalton'). La FHA y la pertactina se pueden tratar con formaldehído antes de su uso de acuerdo con la invención. El PT se puede detoxificar por tratamiento con formaldehído y/o glutaraldehído pero, como una alternativa a este procedimiento de detoxificación química, puede ser un PT mutante en el que la actividad enzimática se ha reducido por mutagénesis [50]. Algunos antígenos de pertussis acelulares adicionales que se pueden usar incluyen fimbrias (por ejemplo, aglutinógenos 2 y 3).

45 Cuando una composición incluye uno de toxoide de difteria, toxoide del tétanos o un antígeno de pertussis acelular en el componente (2), entonces está incluida normalmente los tres, es decir, el componente (2) incluirá una combinación de D-T-Pa.

Primer grupo de antígenos

(1) spr0057

55 La secuencia 'spr0057' original se anotó en la referencia 84 como 'Precursor de beta-N-acetil-hexosaminidasa' (véase el documento GI: 15902101). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr0057 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, se proporciona como la SEQ ID NO: 1 en el presente documento.

Algunos polipéptidos spr0057 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 1; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 1, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr0057 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 1. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 1. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 1 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 1. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Un fragmento adecuado es la SEQ ID NO: 180, que omite el péptido líder natural y secuencias de reconocimiento de sortasa.

Se ha mostrado que algunas combinaciones de spr0057 con otros antígenos neumocócicos tienen buenos efectos sinérgicos.

(2) spr0286

- 15 La secuencia 'spr0286' original se anotó en la referencia 84 como 'Precursor de la hialuronato liasa' (véase el documento GI: 15902330). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr0286 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, se proporciona como SEQ ID NO: 2 en el presente documento.

Algunos polipéptidos spr0286 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 2; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 2, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr0286 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 2. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 2. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 2 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 2. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Un fragmento adecuado es la SEQ ID NO: 181, que omite el péptido líder natural y secuencias de reconocimiento de sortasa. Otros fragmentos adecuados son las SEQ ID NOs: 182 y 183.

30 (3) spr0565

La secuencia 'spr0565' original se anotó en la referencia 84 como 'precursor de beta-galactosidasa' (véase el documento GI: 15902609). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr0565 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, se proporciona como SEQ ID NO: 3 en el presente documento.

- 35 Algunos polipéptidos spr0565 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 3; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 3, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr0565 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, SEQ ID NO: 66; véase a continuación). Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 3. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 3 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 3. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Un fragmento adecuado es la SEQ ID NO: 184, que omite el péptido líder natural y secuencias de reconocimiento de sortasa. Otros fragmentos adecuados son las SEQ ID NOs: 177 y 178.

- Una forma variante de spr0565 es la SEQ ID NO: 66 en el presente documento. El uso de esta forma variante para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 178 en la misma). Algunos polipéptidos spr0565 útiles pueden comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 66; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 66, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estos polipéptidos incluyen variantes de la SEQ ID NO: 66. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 66. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 66 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 66. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.

Algunos fragmentos inmunogénico de la SEQ ID NO: 66 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

Dado que spr0565 en la naturaleza es un polipéptido largo (> 2000 aa), puede ser más conveniente expresar fragmentos. Por lo tanto como una forma adecuada de spr0565 para su uso con la invención puede tener una longitud inferior a 1500 aminoácidos (por ejemplo, < 1400, < 1300, < 1200, < 1100, etc.). Tales formas cortas de spr0565 incluyen 'spr0565A' (SEQ ID NO: 177) y 'spr0565B' (SEQ ID NO: 178).

- 5 Se ha mostrado que algunas combinaciones de spr0565 con otros antígenos neumocócicos tienen buenos efectos sinérgicos.

(4) *spr1098*

La secuencia 'spr1098' original se anotó en la referencia 84 como 'Sortasa' (véase el documento GI: 15903141). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr1098 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, se proporciona como SEQ ID NO: 4 en el presente documento.

Algunos polipéptidos spr1098 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 4; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 4, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr1098 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 4. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 4. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 4 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 4. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Un fragmento adecuado es la SEQ ID NO: 187, que omite la secuencia peptídica líder natural.

(5) *spr1345*

La secuencia 'spr1345' original se anotó en la referencia 84 como 'proteína hipotética' (véase el documento GI: 15903388). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr1345 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, se proporciona como SEQ ID NO: 5 en el presente documento.

Algunos polipéptidos spr1345 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 5; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 5, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr1345 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 5. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 5. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 5 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 5. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Un fragmento adecuado es la SEQ ID NO: 188, que omite el péptido líder natural y secuencias de reconocimiento de sortasa.

(6) *spr1416*

La secuencia 'spr1416' original se anotó en la referencia 84 como 'proteína hipotética' (véase el documento GI: 15903459). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr1416 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, se proporciona como SEQ ID NO: 6 en el presente documento.

Algunos polipéptidos spr1416 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 6; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 6, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr1416 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 6. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 6. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 6 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 6. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.

(7) *spr1418*

La secuencia 'spr1418' original se anotó en la referencia 84 como 'proteína hipotética' (véase el documento GI: 15903461). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr1418 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, se proporciona como SEQ ID NO: 7 en el presente documento.

Algunos polipéptidos spr1418 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 7; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 7, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr1418 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 7. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 7. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 7 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 7. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.

Segundo grupo de antígenos

(1) spr0867

La secuencia 'spr0867' original se anotó en la referencia 84 como 'Endo-beta-N-acetilglucosaminidasa' (véase el documento GI: 15902911). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr0867 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, se proporciona como SEQ ID NO: 8 en el presente documento.

Algunos polipéptidos spr0867 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 8; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 8, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr0867 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 8. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 8. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 8 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 8. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Un fragmento adecuado es la SEQ ID NO: 185, que omite la secuencia peptídica líder natural.

(2) spr1431

La secuencia 'spr1431' original se anotó en la referencia 84 como '1,4-beta-N-acetilmuramidasa' (véase el documento GI: 15903474). También se conoce como 'LytC', y su uso para inmunización se informa en la referencia 67. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr1431 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, se proporciona como SEQ ID NO: 9 en el presente documento.

Algunos polipéptidos spr1431 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 9; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 9, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr1431 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 9. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 9. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 9 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 9. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Un fragmento adecuado es la SEQ ID NO: 189, que omite la secuencia peptídica líder natural.

(3) spr1739

El polipéptido 'spr1739' es la neumolisina (por ejemplo, véase el documento GI: 15903781). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr1739 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, se proporciona como SEQ ID NO: 10 en el presente documento.

Algunos polipéptidos spr1739 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 10; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 10, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr1739 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 10. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 10. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 10 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 10. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.

En la técnica se conocen algunas formas mutantes de la neumolisina para uso en vacunación [26, 51-56], y estas formas mutantes se pueden usar con la invención. La detoxificación se puede conseguir mediante truncamiento C-terminal (por ejemplo, véase la ref. 57) por ejemplo con delección de 34 aminoácidos, 45 aminoácidos, 7 aminoácidos [58], etc. Algunas mutaciones adicionales, numeradas de acuerdo con la SEQ ID NO: 20, incluyen Pro325→Leu (por ejemplo, SEQ ID NO: 169) y/o Trp433→Phe (por ejemplo, SEQ ID NO: 171). Estas mutaciones se pueden combinar con truncamientos C-terminales por ejemplo para combinar una mutación de Pro325→Leu con un truncamiento de 7-mer (por ejemplo, SEQ ID NO: 170).

(4) *spr2021*

La secuencia 'spr2021' original se anotó en la referencia 84 como 'Proteína GSP-781 de estrés general' (véase el documento GI: 15904062). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr2021 de longitud completa como se encuentra en la cepa R6, se proporciona como SEQ ID NO: 11 en el presente documento.

Algunos polipéptidos spr2021 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 11; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 11, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr2021 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 11. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 11. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 11 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 11. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Un fragmento adecuado es la SEQ ID NO: 190, que omite la secuencia peptídica líder natural.

Se ha mostrado que algunas combinaciones de spr2021 con otros antígenos neumocócicos tienen buenos efectos sinérgicos.

La referencia 10 anota a spr2021 como una proteína de 45 kDa secretada con homología con respecto a GbpB y desvela uso como un agente inmunógeno (SEQ ID NO: 243 en la misma; SP2216). Algunos fragmentos inmunogénicos de spr2021 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10 (página 73). Otro fragmento útil de spr2021 se desvela como la SEQ ID NO: 1 de la referencia 59 (aminoácidos 28-278 de la SEQ ID NO: 11 en el presente documento).

Tercer grupo de antígenos

(1) *spr0096*

La secuencia 'spr0096' original se anotó en la referencia 84 como 'proteína hipotética' (véase el documento GI: 15902140). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr0096 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, se proporciona como SEQ ID NO: 12 en el presente documento.

Algunos polipéptidos spr0096 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 12; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 12, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr0096 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 12 (por ejemplo, SEQ ID NO: 40; véase a continuación). Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 12. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 12 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 12. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.

Se ha mostrado que algunas combinaciones de spr0096 con otros antígenos neumocócicos tienen buenos efectos sinérgicos.

Una forma variante de spr0096, con una inserción cerca de su extremo C-terminal con respecto a la SEQ ID NO: 12, es la SEQ ID NO: 40 en el presente documento. El uso de esta variante para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 150 en la misma), en la que se anota como la proteína del dominio de LysM. Por lo tanto, un spr0096 para su uso con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 40; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 40, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estos polipéptidos incluyen variantes de la SEQ ID NO: 40. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 40. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal

de la SEQ ID NO: 40 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 40. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Algunos fragmentos inmunogénico de la SEQ ID NO: 40 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

Un polipéptido spr0096 se puede usar en forma de un dímero, por ejemplo un homodímero.

5 (2) *spr1433*

La secuencia 'spr1433' original se anotó en la referencia 84 como 'proteína hipotética' (véase el documento GI: 15903476). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr1433 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, en el presente documento se proporciona como la SEQ ID NO: 13.

10 Algunos polipéptidos spr1433 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 13; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 13, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr1433 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 13. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 13. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 13 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 13. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.

(3) *spr1707*

20 La secuencia 'spr1707' original se anotó en la referencia 84 como 'proteína de unión a sustrato transportadora de ABC – transporte de oligopéptidos' (véase el documento GI: 15903749). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr1707 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, se proporciona como SEQ ID NO: 14 en el presente documento. Algunos polipéptidos spr1707 preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 14; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 14, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas spr1707 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 14 (por ejemplo, SEQ ID NO: 100; véase a continuación). Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 14. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 14 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 14. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.

35 Una forma variante de spr1707, que se diferencia de la SEQ ID NO: 14 en 4 aminoácidos, es la SEQ ID NO: 100 en el presente documento. El uso de SEQ ID NO: 100 a la inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 220 en la misma). Por lo tanto, un polipéptido spr1707 para su uso con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 100; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 100, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estos polipéptidos incluyen variantes de la SEQ ID NO: 100. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 100. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 100 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 100. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.

Algunos fragmentos inmunogénico de la SEQ ID NO: 100 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

Otros antígenos neumocócicos

ClpP

50 ClpP es la subunidad proteolítica de la proteasa Clp dependiente de ATP. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de ClpP de longitud completa es la SEQ ID NO: 16 en el presente documento. En el genoma de R6, ClpP es spr0656 [84].

El uso de ClpP para inmunización se informa en las referencias 60 y 61. Se puede usar de forma ventajosa en combinación con PspA y PsaA y/o PspC [60].

LytA

LytA es la N-acetilmuramoi-L-alanina amidasa (autolisina). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de LytA de longitud completa es la SEQ ID NO: 17 en el presente documento. En el genoma de R6, LytA es spr1754 [84].

- 5 El uso de LytA para inmunización se informa en la referencia 62, en particular en una forma que comprende el dominio de unión de LytA fusionado con un epítipo auxiliar T promiscuo heterólogo.

PhtA

PhtA es la proteína A de la tríada de histidina neumocócica. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos del precursor de PhtA de longitud completa es la SEQ ID NO: 18 en el presente documento. En el genoma de R6, PhtA es spr1061 [84].

- 10

El uso de PhtA para inmunización se informa en la referencias 63 y 64. PhtB

PhtB es la proteína B de la tríada de histidina neumocócica. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos del precursor de PhtB de longitud completa es la SEQ ID NO: 19 en el presente documento. Xaa en el resto 578 puede ser Lisina.

- 15 El uso de PhtB para inmunización se informa en la referencia 2, 63 y 64.

Ph tD

PhtD es la proteína D de la tríada de histidina neumocócica. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos del precursor de PhtD de longitud completa es la SEQ ID NO: 20 en el presente documento. En el genoma de R6, PhtD es spr0907 [84].

- 20 El uso de PhtD para inmunización se informa en la referencias 63, 64 y 65.

PhtE

PhtE es la proteína QUE de la tríada de histidina neumocócica. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos del precursor de PhtE de longitud completa es la SEQ ID NO: 21 en el presente documento. En el genoma de R6, PhtE es spr0908 [84].

- 25 El uso de PhtE para inmunización se informa en la referencias 63 y 64.

ZmpB

ZmpB es la metaloproteasa de cinc. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de de ZmpB longitud completa es la SEQ ID NO: 22 en el presente documento. En el genoma de R6, ZmpB es spr0581 [84].

CbpD

CbpD es la proteína D de unión a Colina. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de CbpD de longitud completa es la SEQ ID NO: 23 en el presente documento. En el genoma de R6, CbpD es spr2006 [84].

- 30

El uso de CbpD para inmunización se informa en la referencia 67. Una variante de la SEQ ID NO: 23 es la SEQ ID NO: 119 en el presente documento. El uso de SEQ ID NO: 119 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 241 en la misma). Algunos fragmentos inmunogénicos de la SEQ ID NO: 119 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

- 35

CbpG

CbpG es la proteína G de unión a Colina. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de CbpG de longitud completa es la SEQ ID NO: 24 en el presente documento. En el genoma de R6, CbpG es spr0350 [84].

El uso de CbpG para inmunización se informa en la referencia 67.

- 40 *PvaA*

PvaA (antígeno A de la vacuna neumocócica de *Streptococcus pneumoniae*) también se conoce como sp101. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de PvaA de longitud completa es la SEQ ID NO: 25 en el presente documento. En el genoma de R6, PvaA es spr0930 [84].

El uso de PvaA para inmunización se informa en la referencias 1 y 318.

- 45

CPL1

CPL1 es la lisozima CP1 de fago neumocócico. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de CPL1 de longitud completa es la SEQ ID NO: 26 en el presente documento.

- 5 El uso de CPL1 para inmunización se informa en la referencia 62, en particular en una forma que comprende el dominio de unión a colina CPL1 fusionado con un epítipo auxiliar T promiscuo heterólogo.

PspC

PspC es la proteína C de superficie neumocócica [66] Italia se conoce como proteína A de unión a colina (CbpA). Su uso para inmunización se informa en la referencias 1 y 67. En la cepa R6, es spr1995 y, para referencia, la secuencia de aminoácidos de spr1995 de longitud completa es la SEQ ID NO: 15 en el presente documento.

- 10 Una variante de PspC se conoce como 'Hic'. Es similar a PspC, como se muestra en la Figura 1 de la referencia 68, en la que se informa que se une al factor H (fH). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de Hic de longitud completa es la SEQ ID NO: 27 en el presente documento. Una proteína Hic se puede usar en la invención además de o en lugar de un polipéptido PspC.

PspC y/o Hic se pueden usar de forma ventajosa en combinación con PspA y/o PsaA.

- 15 *Pmp*

Pmp es una peptidilprolil isomerasa, también conocida como proteína de maduración de proteasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de Pmp longitud completa es la SEQ ID NO: 28 en el presente documento. En el genoma de R6, Pmp es spr0884 [84].

- 20 Algunos polipéptidos Pmp preferentes para uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 28; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 28, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas Pmp incluyen variantes de la SEQ ID NO: 28. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 28. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 28 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 28. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Un fragmento adecuado es la SEQ ID NO: 186, que omite la secuencia peptídica líder natural.

- 30 El uso de Pmp para inmunización se informa en la referencia 69.

PspA

PspA es la proteína A de superficie neumocócica. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de PspA de longitud completa es la SEQ ID NO: 29 en el presente documento. En el genoma de R6, PspA es spr0121 [84]. El uso de PspA para inmunización se informa, entre otros, en la referencia 70. De forma ventajosa, se puede administrar en combinación con PspC.

- 35

PsaA

PsaA es la adhesina de superficie neumocócica. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de PsaA de longitud completa es la SEQ ID NO: 30 en el presente documento.

- 40 Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Un fragmento de PsaA útil se desvela como la SEQ ID NO: 3 en la referencia 59 (que corresponde a los aminoácidos 21-309 de la SEQ ID NO: 30 en el presente documento).

El uso de PsaA para inmunización se informa en la referencia 71. Se puede usar en combinación con PspA y/o PspC.

PrtA

- 45 PrtA es la serina proteinasa asociada con la pared celular. También se ha conocido como sp128 y sp130, y se encuentra en una serina proteasa similar a la subtilisina. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos del precursor de PrtA de longitud completa es la SEQ ID NO: 31 en el presente documento. En el genoma de R6, PrtA es spr0561 [84].

El uso de PrtA para inmunización se informa en la referencias 72 y 73, y también en la referencia 1.

- 50

Sp133

Sp133 es un antígeno neumocócico conservado. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de de Sp133 longitud completa es la SEQ ID NO: 32 en el presente documento. En el genoma de R6, Sp133 es spr0931 [84].

El uso de Sp133 para inmunización se informa en la referencia 74.

5 *PiaA*

PiaA es la permeasa de membrana implicada en la adquisición de hierro por los neumococos. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de PiaA de longitud completa es la SEQ ID NO: 33 en el presente documento. En el genoma de R6, PiaA es spr0935 [84].

El uso de PiaA para inmunización se informa en la referencias 75, 76 y 77, en particular en combinación con PiuA.

10 *PiuA*

PiuA es la proteína de unión al sustrato transportadora de ABC para transporte de hierro férrico. También se conoce como FatB. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de PiuA de longitud completa es la SEQ ID NO: 34 en el presente documento. En el genoma de R6, PiuA es spr1687 [84].

El uso de PiuA para inmunización se informa en las preferencias 75 to 77, en particular en combinación con PiaA.

15 *IC1*

IC1 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC1 de longitud completa es la SEQ ID NO: 35 en el presente documento. En el genoma de R6, IC1 es spr0008 [84]. El uso de IC1 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 145 en la misma).

20 Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Los fragmentos inmunogénicos de IC1 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC2

IC2 es la polimerasa I del ADN de polA. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC2 de longitud completa es la SEQ ID NO: 36 en el presente documento. En el genoma de R6, IC2 es spr0032 [84]. El uso de IC2 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 146 en la misma). Los fragmentos inmunogénicos de IC2 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

25

IC3

IC3 es una proteína de unión a colina. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC3 de longitud completa es la SEQ ID NO: 37 en el presente documento. En el genoma de R6, IC3 es spr1945 [84]. El uso de IC3 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 147 en la misma).

30 Los fragmentos inmunogénicos de IC3 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC4

IC4 es una proteasa de IgA1. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC4 de longitud completa es la SEQ ID NO: 38 en el presente documento. En el genoma de R6, IC4 es spr1042 [84]. El uso de IC4 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 148 en la misma).

35 Los fragmentos inmunogénicos de IC4 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC5

IC5 se anota como una proteína hipotética, pero quizá es un ancla de la superficie de la pared celular. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC5 de longitud completa es la SEQ ID NO: 39 en el presente documento. En el genoma de R6, IC5 es spr0075 [84]. El uso de IC5 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 149 en la misma).

40

Los fragmentos inmunogénicos de IC5 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC6

IC6 es una forma variante de spr0096, como se ha informado anteriormente (SEQ ID NO: 40 en el presente documento).

45

IC7

5 IC7 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC7 de longitud completa es la SEQ ID NO: 41 en el presente documento. En el genoma de R6, IC7 es spr0174 [84]. El uso de IC7 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 152 en la misma). Los fragmentos inmunogénicos de IC7 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC8

10 IC8 es una Dihidrofolato:folilpoliglutamato sintetasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC8 de longitud completa es la SEQ ID NO: 42 en el presente documento. En el genoma de R6, IC8 es spr0178 [84]. El uso de IC8 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 153 en la misma).
Los fragmentos inmunogénicos de IC8 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC9

15 IC9 es una proteína L2 de la subunidad ribosómica 50S. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC9 de longitud completa es la SEQ ID NO: 43 en el presente documento. En el genoma de R6, IC9 es spr0191 [84]. El uso de IC9 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 154 en la misma).
Los fragmentos inmunogénicos de IC9 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC10

20 IC10 es una proteína S14 de la subunidad ribosómica 30S. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC10 de longitud completa es la SEQ ID NO: 44 en el presente documento. En el genoma de R6, IC10 es spr0202 [84]. El uso de IC10 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 155 en la misma).
Los fragmentos inmunogénicos de IC10 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC11

25 IC11 se anotan la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC11 de longitud completa es la SEQ ID NO: 45 en el presente documento. En el genoma de R6, IC11 es spr0218 [84]. El uso de IC11 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 156 en la misma).
Los fragmentos inmunogénicos de IC11 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10. IC12

IC12 es una Formiato acetiltransferasa 3. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de d IC12 e longitud completa es la SEQ ID NO: 46 en el presente documento. En el genoma de R6, IC12 es spr0232 [84]. El uso de IC12 a la inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 157 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC12 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

30 *IC13*

IC13 es una proteína S9 de la subunidad ribosómica 30S. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC13 de longitud completa es la SEQ ID NO: 47 en el presente documento. En el genoma de R6, IC13 es spr0272 [84]. El uso de IC13 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 158 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC 13 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

35 *IC14*

IC14 es un regulador de la transcripción. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC14 de longitud completa es la SEQ ID NO: 48 en el presente documento. En el genoma de R6, IC14 es spr0298 [84]. El uso de IC14 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 159 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC 14 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

40 *IC15*

IC15 se anota en la referencia 10 como una proteína de la familia de anclaje de la superficie de la pared celular. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC15 de longitud completa es la SEQ ID NO: 49 en el presente documento. En el genoma de R6, IC15 es spr0328 [84]. El uso de IC15 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 160 en la misma), y se muestra que es protector en la referencia 78 (antígeno SP0368).

45 Los fragmentos inmunogénicos de IC15 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC16

IC16 es una proteína 1A de unión a penicilina. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC16 de longitud completa es la SEQ ID NO: 50 en el presente documento. En el genoma de R6, IC16 es spr0329 [84]. El uso de IC16 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 161 en la misma).

5 Los fragmentos inmunogénicos de IC16 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC17

IC17 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC17 de longitud completa es la SEQ ID NO: 51 en el presente documento. En el genoma de R6, IC17 es spr0334 [84]. El uso de IC 17 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 162 en la misma).

10

Los fragmentos inmunogénicos de IC 17 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC18

IC18 se anota en la referencia 10 como una proteína F de unión a colina. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC18 de longitud completa es la SEQ ID NO: 52 en el presente documento. En el genoma de R6, IC18 es spr0337 [84]. El uso de IC18 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 163 en la misma).

15

Los fragmentos inmunogénicos de IC18 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10. IC19

IC19 se anota en la referencia 10 como una proteína J de unión a colina (cbpJ). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC19 de longitud completa es la SEQ ID NO: 53 en el presente documento. El uso de IC19 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 164 en la misma).

20

Los fragmentos inmunogénicos de IC 19 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC20

IC20 es una proteína G de unión a colina. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC20 de longitud completa es la SEQ ID NO: 54 en el presente documento. En el genoma de R6, IC20 es spr0349 [84]. El uso de IC20 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 165 en la misma).

25

Los fragmentos inmunogénicos de IC20 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC21

IC21 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC21 de longitud completa es la SEQ ID NO: 55 en el presente documento. En el genoma de R6, IC21 es spr0410 [84]. El uso de IC21 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 166 en la misma).

30

Los fragmentos inmunogénicos de IC21 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC22

IC22 se anota en la referencia 10 como proteína de la familia de anclaje de la superficie de la pared celular. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC22 de longitud completa es la SEQ ID NO: 56 en el presente documento. En el genoma de R6, IC22 es spr0051 [84]. El uso de IC22 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 167 en la misma).

35

Los fragmentos inmunogénicos de IC22 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC23

IC23 es una Sortasa (*cf.* spr1098). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC23 de longitud completa es la SEQ ID NO: 57 en el presente documento. El uso de IC23 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 168 en la misma).

40

Los fragmentos inmunogénicos de IC23 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC24

IC24 es una Sortasa (*cf.* spr1098). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC24 de longitud completa es la SEQ ID NO: 58 en el presente documento. El uso de IC24 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 169 en la misma).

45

Los fragmentos inmunogénicos de IC24 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC25

5 IC25 se anota en la referencia 10 como una supuesta endo- β -N-acetilglucosaminidasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC25 de longitud completa es la SEQ ID NO: 59 en el presente documento. En el genoma de R6, IC25 es spr0440 [84]. El uso de IC25 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 170 en la misma).

10 Los fragmentos inmunogénicos de IC25 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10. IC26
IC26 es una enzima de modificación de restricción de tipo I de EcoE. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC26 de longitud completa es la SEQ ID NO: 60 en el presente documento. En el genoma de R6, IC26 es spr0449 [84]. El uso de IC26 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 171 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC26 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC27

15 IC27 se anota en la referencia 10 como una proteína J de ADN. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC27 de longitud completa es la SEQ ID NO: 61 en el presente documento. En el genoma de R6, IC27 es spr0456 [84]. El uso de IC27 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 172 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC27 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC28

20 IC28 se anota en la referencia 10 como una transportadora de ABC de BlpC (blpB). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC28 de longitud completa es la SEQ ID NO: 62 en el presente documento. En el genoma de R6, IC28 es spr0466 [84]. El uso de IC28 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 173 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC28 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

25 *IC29*

IC29 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC29 de longitud completa es la SEQ ID NO: 63 en el presente documento. En el genoma de R6, IC29 es spr0488 [84]. El uso de IC29 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 174 en la misma).

30 Los fragmentos inmunogénicos de IC29 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC30

35 IC30 es una proteína de unión a sustrato transportadora de ABC. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC30 de longitud completa es la SEQ ID NO: 64 en el presente documento. En el genoma de R6, IC30 es spr0534 [84]. El uso de IC30 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 175 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC30 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC31

40 IC31 se anota en la referencia 10 como una proteína de la superfamilia de la metalo- β -lactamasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC31 de longitud completa es la SEQ ID NO: 65 en el presente documento. En el genoma de R6, IC31 es spr0538 [84]. El uso de IC31 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 176 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC31 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC32

45 IC32 es una forma variante de spr0565, como se ha mencionado anteriormente (SEQ ID NO: 66 en el presente documento). Algunos fragmentos inmunogénicos de SEQ ID NO: 66 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC33

5 IC33 se anota en la referencia 10 como una supuesta proteína de superficie neumocócica. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC33 de longitud completa es la SEQ ID NO: 67 en el presente documento. En el genoma de R6, IC33 es spr0583 [84]. El uso de IC33 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 180 en la misma) y en la referencia 78 (antígeno SP0667) se muestra que es protectora. Los fragmentos inmunogénicos de IC33 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC34

10 IC34 es una UDP-N-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamato sintetasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC34 de longitud completa es la SEQ ID NO: 68 en el presente documento. En el genoma de R6, IC34 es spr0603 [84]. El uso de IC34 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 181 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC34 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC35

15 IC35 es una proteína de unión al sustrato transportadora de ABC. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC35 de longitud completa es la SEQ ID NO: 69 en el presente documento. En el genoma de R6, IC35 es spr0659 [84]. El uso de IC35 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 182 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC35 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC36

20 IC36 es una proteína de unión a ATP transportadora de ABC. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC36 de longitud completa es la SEQ ID NO: 70 en el presente documento. En el genoma de R6, IC36 es spr0678 [84]. El uso de IC36 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 183 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC36 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC37

25 IC37 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC37 de longitud completa es la SEQ ID NO: 71 en el presente documento. En el genoma de R6, IC37 es spr0693 [84]. El uso de IC37 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 184 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC37 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

30 *IC38*

IC38 se anota en la referencia 10 como una proteína relacionada con nodulina con truncamiento. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC38 de longitud completa es la SEQ ID NO: 72 en el presente documento. En el genoma de R6, IC38 es spr0814 [84]. El uso de IC38 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 185 en la misma).

35 Los fragmentos inmunogénicos de IC38 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC39

40 IC39 es una proteína E de unión a fosforilcolina esterasa de ácido Teicoico/colina (cbpE). También se puede conocer como 'LytD'. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC39 de longitud completa es la SEQ ID NO: 73 en el presente documento. En el genoma de R6, IC39 es spr0831 [84]. El uso de IC39 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 186 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC39 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC40

45 IC40 es una proteína A de división inhibida por glucosa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC40 de longitud completa es la SEQ ID NO: 74 en el presente documento. En el genoma de R6, IC40 es spr0844 [84]. El uso de IC40 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 187 en la misma). Los fragmentos inmunogénicos de IC40 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC41

IC41 es una Alanina deshidrogenasa, truncamiento. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC41 de longitud completa es la SEQ ID NO: 75 en el presente documento. En el genoma de R6, IC41 es spr0854 [84]. El uso de IC41 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 188 en la misma).

- 5 Los fragmentos inmunogénicos de IC41 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC42

IC42 es una glucógeno sintasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC42 de longitud completa es la SEQ ID NO: 76 en el presente documento. En el genoma de R6, IC42 es spr1032 [84]. El uso de IC42 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 191 en la misma).

- 10 Los fragmentos inmunogénicos de IC42 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC43

IC43 es una Inmunoglobulina A1 proteasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC43 de longitud completa es la SEQ ID NO: 77 en el presente documento. El uso de IC43 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 192 en la misma).

- 15 Los fragmentos inmunogénicos de IC43 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC44

IC44 es una enzima de restricción sin caracterizar. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC44 de longitud completa es la SEQ ID NO: 78 en el presente documento. En el genoma de R6, IC44 es spr1101 [84]. El uso de IC44 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 195 en la misma).

- 20 Los fragmentos inmunogénicos de IC44 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10. IC45 es un regulador de respuesta. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC45 de longitud completa es la SEQ ID NO: 79 en el presente documento. En el genoma de R6, IC45 es spr1107 [84]. El uso de IC45 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 196 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC45 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

- 25 *IC46*

IC46 es una permeasa transmembrana transportadora de ABC. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC46 de longitud completa es la SEQ ID NO: 80 en el presente documento. En el genoma de R6, IC46 es spr1120 [84]. El uso de IC46 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 197 en la misma).

- 30 Los fragmentos inmunogénicos de IC46 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC47

IC47 es una partícula de reconocimiento de señales. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC47 de longitud completa es la SEQ ID NO: 81 en el presente documento. En el genoma de R6, IC47 es spr1166 [84]. El uso de IC47 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 198 en la misma).

- 35 Los fragmentos inmunogénicos de IC47 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC48

IC48 es una N-acetilmanosamina-6-fosfato 2-epimerasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC48 de longitud completa es la SEQ ID NO: 82 en el presente documento. En el genoma de R6, IC48 es spr1529 [84]. El uso de IC48 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 199 en la misma).

- 40 Los fragmentos inmunogénicos de IC48 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC49

IC49 es una corismato sintasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC49 de longitud completa es la SEQ ID NO: 83 en el presente documento. En el genoma de R6, IC49 es spr1232 [84]. El uso de IC49 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 200 en la misma).

- 45 Los fragmentos inmunogénicos de IC49 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC50

5 IC50 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC50 de longitud completa es la SEQ ID NO: 84 en el presente documento. En el genoma de R6, IC50 es spr1236 [84]. El uso de IC50 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 201 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC50 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC51

10 IC51 es una Proteasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC51 de longitud completa es la SEQ ID NO: 85 en el presente documento. En el genoma de R6, IC51 es spr1284 [84]. El uso de IC51 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 202 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC51 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC52

15 IC52 se anota en la referencia 10 como una oxidoreductasa o aldo/ceto reductasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC52 de longitud completa es la SEQ ID NO: 86 en el presente documento. En el genoma de R6, IC52 es spr1332 [84]. El uso de IC52 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 203 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC52 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC53

20 IC53 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC53 de longitud completa es la SEQ ID NO: 87 en el presente documento. En el genoma de R6, IC53 es spr1370 [84]. El uso de IC53 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 204 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC53 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC54

25 IC54 se anota como una proteína de dominio conservado. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC54 de longitud completa es la SEQ ID NO: 88 en el presente documento. En el genoma de R6, IC54 es spr1374 [84]. El uso de IC54 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 205 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC54 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC55

30 IC55 es una proteína de unión al sustrato transportadora de ABC. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC55 de longitud completa es la SEQ ID NO: 89 en el presente documento. En el genoma de R6, IC55 es spr1382 [84]. El uso de IC55 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 206 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC55 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

35 *IC56*

IC56 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC56 de longitud completa es la SEQ ID NO: 90 en el presente documento. En el genoma de R6, IC56 es spr1457 [84]. El uso de IC56 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 208 en la misma).

40 Los fragmentos inmunogénicos de IC56 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC57

IC57 es una proteína de inicio de la división celular. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC57 de longitud completa es la SEQ ID NO: 91 en el presente documento. En el genoma de R6, IC57 es spr1505 [84]. El uso de IC57 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 209 en la misma).

45 Los fragmentos inmunogénicos de IC57 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC58

IC58 se anota en la referencia 10 como proteína ylmF. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC58 de longitud completa es la SEQ ID NO: 92 en el presente documento. En el genoma de R6, IC58 es spr1508 [84]. El uso de IC58 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 210 en la misma).

- 5 Los fragmentos inmunogénicos de IC58 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC59

IC59 es una subunidad de N-acetilneuraminato liasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC59 de longitud completa es la SEQ ID NO: 93 en el presente documento. En el genoma de R6, IC59 es spr1186 [84]. El uso de IC59 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 211 en la misma).

- 10 Los fragmentos inmunogénicos de IC59 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC60

IC60 es una serina/treonina quinasa de tipo eucariótico (StkP). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC60 de longitud completa es la SEQ ID NO: 94 en el presente documento. En el genoma de R6, IC60 es spr1577 [84]. El uso de IC60 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 214 en la misma), y se informa que es un candidato a vacuna líder en la referencia 78.

- 15 Los fragmentos inmunogénicos de IC60 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10. Un fragmento útil adicional se desvela como la SEQ ID NO: 2 en la referencia 59 (que corresponde a los aminoácidos 345-659 de la SEQ ID NO: 94 en el presente documento).

IC61

- 20 IC61 es una metionil-ARNt formiltransferasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC61 de longitud completa es la SEQ ID NO: 95 en el presente documento. En el genoma de R6, IC61 es spr1580 [84]. El uso de IC61 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 215 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC61 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC62

- 25 IC62 es una translocasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC62 de longitud completa es la SEQ ID NO: 96 en el presente documento. En el genoma de R6, IC62 es spr1544 [84]. El uso de IC62 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 216 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC62 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC63

- 30 IC63 se anota en la referencia 10 como una proteína de la familia de anclaje de la superficie de la pared celular. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC63 de longitud completa es la SEQ ID NO: 97 en el presente documento. En el genoma de R6, IC63 es spr1403 [84]. El uso de IC63 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 217 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC63 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10. *IC64*

- 35 IC64 se anota en la referencia 10 como una supuesta proteína de estrés general 24. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC64 de longitud completa es la SEQ ID NO: 98 en el presente documento. En el genoma de R6, IC64 es spr1625 [84]. El uso de IC64 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 218 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC64 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

- 40 *IC65*

IC65 es una proteína de unión a ATP transportadora de ABC. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC65 de longitud completa es la SEQ ID NO: 99 en el presente documento. En el genoma de R6, IC65 es spr1704 [84]. El uso de IC65 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 219 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC65 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

- 45 *IC66*

IC66 es, como se ha mencionado anteriormente, una forma variante de spr1707. Algunos polipéptidos IC66 útiles para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o

- superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 100; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 100, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas IC66 incluyen variantes de la SEQ ID NO: 100. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 100. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 100 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 100. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.
- 5
- 10 *IC67*
- IC67 es una serina proteasa similar a la subtilisina. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC67 de longitud completa es la SEQ ID NO: 101 en el presente documento. En el genoma de R6, IC67 es spr1771 [84]. El uso de IC67 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 222 en la misma).
- Los fragmentos inmunogénicos de IC67 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.
- 15 *IC68*
- IC68 es un factor 1 de unión a Cmp. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC68 de longitud completa es la SEQ ID NO: 102 en el presente documento. En el genoma de R6, IC68 es spr1794 [84]. El uso de IC68 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 223 en la misma).
- Los fragmentos inmunogénicos de IC68 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10. IC69
- 20 *IC69* se anota en la referencia 10 como proteína de la familia de anclaje de la superficie de la pared celular. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC69 de longitud completa es la SEQ ID NO: 103 en el presente documento. En el genoma de R6, IC69 es spr1806 [84]. El uso de IC69 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 224 en la misma).
- Los fragmentos inmunogénicos de IC69 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.
- 25 *IC70*
- IC70 es una proteína A de control de catabolito A. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC70 de longitud completa es la SEQ ID NO: 104 en el presente documento. En el genoma de R6, IC70 es spr1813 [84]. El uso de IC70 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 225 en la misma).
- Los fragmentos inmunogénicos de IC70 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.
- 30 *IC71*
- IC71 es una Beta-glucosidasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC71 de longitud completa es la SEQ ID NO: 105 en el presente documento. En el genoma de R6, IC71 es spr1833 [84]. El uso de IC71 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 226 en la misma). Los fragmentos inmunogénicos de IC71 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.
- 35 *IC72*
- IC72 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC72 de longitud completa es la SEQ ID NO: 106 en el presente documento. En el genoma de R6, IC72 es spr1838 [84]. El uso de IC72 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 227 en la misma).
- 40 Los fragmentos inmunogénicos de IC72 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.
- IC73*
- IC73 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC73 de longitud completa es la SEQ ID NO: 107 en el presente documento. En el genoma de R6, IC73 es spr1850 [84]. El uso de IC73 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 228 en la misma).
- 45 Los fragmentos inmunogénicos de IC73 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.
- IC74*
- IC74 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC74 de longitud completa es la SEQ ID NO: 108 en el presente documento. En el genoma de R6, IC74 es spr1859 [84]. El uso de IC74 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 229 en la
- 50

misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC74 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC75

5 IC75 es una proteína de competencia. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC75 de longitud completa es la SEQ ID NO: 109 en el presente documento. En el genoma de R6, IC75 es spr1862 [84]. El uso de IC75 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 230 en la misma).

10 Los fragmentos inmunogénicos de IC75 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10. IC76 es una UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC76 de longitud completa es la SEQ ID NO: 110 en el presente documento. En el genoma de R6, IC76 es spr1903 [84]. El uso de IC76 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 231 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC76 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC77

15 IC77 es una proteína 1b de unión a penicilina. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC77 de longitud completa es la SEQ ID NO: 111 en el presente documento. En el genoma de R6, IC77 es spr1909 [84]. El uso de IC77 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 232 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC77 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC78

20 IC78 es una proteína de unión al sustrato transportadora de ABC de maltosa/maltodextrina. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC78 de longitud completa es la SEQ ID NO: 112 en el presente documento. En el genoma de R6, IC78 es spr1918 [84]. El uso de IC78 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 233 en la misma). Los fragmentos inmunogénicos de IC78 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC79

25 IC79 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC79 de longitud completa es la SEQ ID NO: 113 en el presente documento. En el genoma de R6, IC79 es spr2120 [84]. El uso de IC79 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 234 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC79 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC80

30 IC80 es una supuesta sección n-terminal de transcetolasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC80 de longitud completa es la SEQ ID NO: 114 en el presente documento. En el genoma de R6, IC80 es spr1937 [84]. El uso de IC80 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 235 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC80 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC81

35 IC81 es una proteína de unión a Colina. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC81 de longitud completa es la SEQ ID NO: 115 en el presente documento. Su extremo C-terminal está relacionado con IC3. El uso de IC81 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 236 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC81 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC82

40 IC82 es una proteína relacionada con la glicosil hidrolasa. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC82 de longitud completa es la SEQ ID NO: 116 en el presente documento. En el genoma de R6, IC82 es spr2141 [84]. El uso de IC82 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 237 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC82 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10. *IC83*

45 IC83 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC83 de longitud completa es la SEQ ID NO: 117 en el presente documento. En el genoma de R6, IC83 es spr1983 [84]. El uso de IC83 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 238 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC83 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC84

5 IC84 es una ATPasa relacionada con la respuesta al estrés de Clase III. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC84 de longitud completa es la SEQ ID NO: 118 en el presente documento. En el genoma de R6, IC84 es spr2000 [84]. El uso de IC84 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 240 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC84 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC85

IC85 es una variante de la SEQ ID NO: 23, mencionada anteriormente (SEQ ID NO: 119). Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.

10 *IC86*

IC86 es una proteína L9 de la subunidad ribosómica 50S. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC86 de longitud completa es la SEQ ID NO: 120 en el presente documento. En el genoma de R6, IC86 es spr2009 [84]. El uso de IC86 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 242 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC86 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

15 *IC87*

IC87 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC87 de longitud completa es la SEQ ID NO: 166 en el presente documento. En el genoma de R6, IC87 es spr0987 [84]. El uso de IC87 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 288 en la misma).

20 Los fragmentos inmunogénicos de IC87 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10. *IC88*
IC88 es una proteína de unión a colina. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC88 de longitud completa es la SEQ ID NO: 122 en el presente documento. En el genoma de R6, IC88 es spr1274 [84]. El uso de IC88 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 244 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC88 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

25 *IC89*

IC89 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC89 de longitud completa es la SEQ ID NO: 123 en el presente documento. El uso de IC89 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 245 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC89 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

30 *IC90*

IC90 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC90 de longitud completa es la SEQ ID NO: 124 en el presente documento. El uso de IC90 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 246 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC90 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

35 *IC91*

IC91 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC91 de longitud completa es la SEQ ID NO: 125 en el presente documento. En el genoma de R6, IC91 es spr0415 [84]. El uso de IC91 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 247 en la misma).

40 Los fragmentos inmunogénicos de IC91 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC92

45 IC92 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC92 de longitud completa es la SEQ ID NO: 126 en el presente documento. En el genoma de R6, IC92 es spr0695 [84]. El uso de IC92 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 248 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC92 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC93

5 IC93 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC93 de longitud completa es la SEQ ID NO: 127 en el presente documento. En el genoma de R6, IC93 es spr1334 [84]. El uso de IC93 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 249 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC93 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC94

10 IC94 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC94 de longitud completa es la SEQ ID NO: 128 en el presente documento. En el genoma de R6, IC94 es spr0242 [84]. El uso de IC94 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 250 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC94 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC95

15 IC95 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC95 de longitud completa es la SEQ ID NO: 129 en el presente documento. En el genoma de R6, IC95 es spr1367 [84]. El uso de IC95 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 251 en la misma). Los fragmentos inmunogénicos de IC95 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC96

20 IC96 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC96 de longitud completa es la SEQ ID NO: 130 en el presente documento. El uso de IC96 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 252 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC96 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC97

25 IC97 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC97 de longitud completa es la SEQ ID NO: 131 en el presente documento. En el genoma de R6, IC97 es spr1502 [84]. El uso de IC97 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 253 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC97 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC98

30 IC98 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC98 de longitud completa es la SEQ ID NO: 132 en el presente documento. En el genoma de R6, IC98 es spr0730 [84]. El uso de IC98 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 254 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC98 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

35 *IC99*

IC99 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC99 de longitud completa es la SEQ ID NO: 133 en el presente documento. En el genoma de R6, IC99 es spr1961 [84]. El uso de IC99 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 255 en la misma).

40 Los fragmentos inmunogénicos de IC99 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC100

IC100 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC100 de longitud completa es la SEQ ID NO: 134 en el presente documento. El uso de IC100 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 256 en la misma).

45 Los fragmentos inmunogénicos de IC100 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC101

5 IC101 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC101 de longitud completa es la SEQ ID NO: 135 en el presente documento. En el genoma de R6, IC101 es spr0516 [84]. El uso de IC101 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 257 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC101 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC102

10 IC102 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC102 de longitud completa es la SEQ ID NO: 136 en el presente documento. En el genoma de R6, IC102 es spr1785 [84]. El uso de IC102 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 258 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC102 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC103

15 IC103 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC103 de longitud completa es la SEQ ID NO: 137 en el presente documento. En el genoma de R6, IC103 es spr0215 [84]. El uso de IC103 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 259 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC103 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC104

20 IC104 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC104 de longitud completa es la SEQ ID NO: 138 en el presente documento. En el genoma de R6, IC104 es spr1815 [84]. El uso de IC104 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 260 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC104 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

25 *IC105*

IC105 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC105 de longitud completa es la SEQ ID NO: 139 en el presente documento. En el genoma de R6, IC105 es spr0102 [84]. El uso de IC105 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 261 en la misma).

30 Los fragmentos inmunogénicos de IC105 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC106

35 IC106 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC106 de longitud completa es la SEQ ID NO: 140 en el presente documento. En el genoma de R6, IC106 es spr1994 [84]. El uso de IC106 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 262 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC106 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC107

40 IC107 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC107 de longitud completa es la SEQ ID NO: 141 en el presente documento. El uso de IC107 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 263 en la misma). Los fragmentos inmunogénicos de IC107 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC108

45 IC108 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC108 de longitud completa es la SEQ ID NO: 142 en el presente documento. El uso de IC108 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 264 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC108 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC109

5 IC109 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC109 de longitud completa es la SEQ ID NO: 143 en el presente documento. En el genoma de R6, IC109 es spr0309 [84]. El uso de IC109 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 265 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC109 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC110

10 IC110 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC110 de longitud completa es la SEQ ID NO: 144 en el presente documento. En el genoma de R6, IC110 es spr1070 [84]. El uso de IC110 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 266 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC110 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC111

15 IC111 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC111 de longitud completa es la SEQ ID NO: 145 en el presente documento. En el genoma de R6, IC111 es spr0258 [84]. El uso de IC111 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 267 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC111 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10. *IC112*

20 IC112 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC112 de longitud completa es la SEQ ID NO: 146 en el presente documento. En el genoma de R6, IC112 es spr0254 [84]. El uso de IC 112 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 268 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC 112 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC113

25 IC113 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC113 de longitud completa es la SEQ ID NO: 147 en el presente documento. En el genoma de R6, IC113 es spr0171 [84]. El uso de IC113 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 269 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC113 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

30 *IC114*

IC114 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC114 de longitud completa es la SEQ ID NO: 148 en el presente documento. El uso de IC114 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 270 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC114 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

35 *IC115*

IC115 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC115 de longitud completa es la SEQ ID NO: 149 en el presente documento. En el genoma de R6, IC115 es spr0464 [84]. El uso de IC 115 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 271 en la misma).

40 Los fragmentos inmunogénicos de IC 115 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC116

45 IC116 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC116 de longitud completa es la SEQ ID NO: 150 en el presente documento. En el genoma de R6, IC116 es spr0026 [84]. El uso de IC116 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 272 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC116 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC117

5 IC117 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC117 de longitud completa es la SEQ ID NO: 151 en el presente documento. En el genoma de R6, IC117 es spr1652 [84]. El uso de IC 117 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 273 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC 117 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC118

10 IC118 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC118 de longitud completa es la SEQ ID NO: 152 en el presente documento. En el genoma de R6, IC118 es spr1783 [84]. El uso de IC118 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 274 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC118 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC119

15 IC119 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC 119 de longitud completa es la SEQ ID NO: 153 en el presente documento. El uso de IC 119 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 275 en la misma). Los fragmentos inmunogénicos de IC 119 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC120

20 IC120 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC120 de longitud completa es la SEQ ID NO: 154 en el presente documento. En el genoma de R6, IC120 es spr1153 [84]. El uso de IC120 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 276 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC120 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC121

25 IC121 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC121 de longitud completa es la SEQ ID NO: 155 en el presente documento. En el genoma de R6, IC121 es spr1977 [84]. El uso de IC121 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 277 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC121 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

30 *IC122*

IC122 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC122 de longitud completa es la SEQ ID NO: 156 en el presente documento. El uso de IC122 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 278 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC 122 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

35 *IC123*

IC123 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC123 de longitud completa es la SEQ ID NO: 157 en el presente documento. En el genoma de R6, IC123 es spr1049 [84]. El uso de IC123 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 279 en la misma).

40 Los fragmentos inmunogénicos de IC123 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC124

45 IC124 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC124 de longitud completa es la SEQ ID NO: 158 en el presente documento. En el genoma de R6, IC124 es spr1811 [84]. El uso de IC124 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 280 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC124 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC125

5 IC125 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC125 de longitud completa es la SEQ ID NO: 159 en el presente documento. En el genoma de R6, IC125 es spr0381 [84]. El uso de IC125 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 281 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC125 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC126

10 IC126 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC126 de longitud completa es la SEQ ID NO: 160 en el presente documento. El uso de IC126 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 282 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC126 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC127

15 IC127 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC127 de longitud completa es la SEQ ID NO: 161 en el presente documento. En el genoma de R6, IC127 es spr0061 [84]. El uso de IC127 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 283 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC127 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC128

20 IC128 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC128 de longitud completa es la SEQ ID NO: 162 en el presente documento. En el genoma de R6, IC128 es spr0641 [84]. El uso de IC128 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 284 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC128 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC129

25 IC129 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC129 de longitud completa es la SEQ ID NO: 163 en el presente documento. En el genoma de R6, IC129 es spr1205 [84]. El uso de IC129 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 285 en la misma).

Los fragmentos inmunogénicos de IC129 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

30 *IC130*

IC130 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC130 de longitud completa es la SEQ ID NO: 164 en el presente documento. En el genoma de R6, IC130 es spr1841 [84]. El uso de IC130 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 286 en la misma).

35 Los fragmentos inmunogénicos de IC130 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

IC131

40 IC131 se anota en la referencia 10 como una proteína hipotética. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de IC131 de longitud completa es la SEQ ID NO: 165 en el presente documento. En el genoma de R6, IC 131 es spr1777 [84]. El uso de IC 131 para inmunización se informa en la referencia 10 (SEQ ID NO: 287 en la misma). Los fragmentos inmunogénicos de IC 131 se identifican en la tabla 1 de la referencia 10.

spr0222

45 La secuencia original 'spr0222' se anotó en la referencia 228 como 'proteína de unión a ATP transportadora de ABC - transporte de hierro' (véase el documento GI: 15457768). Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de spr0222 de longitud completa tal como se encontró en la cepa R6, en el presente documento se proporciona como SEQ ID NO: 121 en el presente documento. Uso en inmunización se sugiere en la referencia 5.

CbiO

CbiO se anota como una subunidad de unión a ATP transportadora de cobalto. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de CbiO de longitud completa es la SEQ ID NO: 167 en el presente documento. En el genoma de R6, CbiO es spr2025 [84]. El uso de CbiO para inmunización se informa en la referencia 6 ('ID2' en la misma).

Proteína S8 de la subunidad ribosómica 30S

Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de la proteína S8 de la subunidad ribosómica 30S es la SEQ ID NO: 168 en el presente documento. En el genoma de R6, la subunidad S8 es spr0203 [84].

RrgA

RrgA es una de las subunidades de superficie del pilus neumocócico [79,80] y es una adhesina importante [81]. Existen al menos dos formas alélicas de RrgA y, para fines de referencia, sus secuencias de aminoácidos son las SEQ ID NOs: 172 y 179 en el presente documento. Los dos alelos están bien conservados en sus extremos N- y C-terminales pero se desvían entre ellos.

Algunos polipéptidos RrgA preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 172; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 172, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas RrgA incluyen variantes de la SEQ ID NO: 172. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 172. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 172 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 172. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Un fragmento adecuado es la SEQ ID NO: 192, que omite el péptido líder natural y secuencias de reconocimiento de sortasa.

Otros polipéptidos RrgA preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 179; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 179, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas RrgA incluyen variantes de la SEQ ID NO: 179. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 179. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 179 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 179. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína. Un fragmento adecuado es la SEQ ID NO: 191, que omite el péptido líder natural y secuencias de reconocimiento de sortasa.

RrgB

RrgB es una de las subunidades de superficie del pilus neumocócico [79, 80]. Existen al menos tres formas alélicas de RrgB y, para fines de referencia, sus secuencias de aminoácidos son las SEQ ID NOs: 173, 174 y 175 en el presente documento. Los tres alelos están bien conservados en sus extremos N- y C-terminales pero se desvían entre ellos.

Algunos polipéptidos RrgB preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 173; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 173, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas RrgB incluyen variantes de la SEQ ID NO: 173. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 173. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 173 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 173. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.

Otros polipéptidos RrgB preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 174; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 174, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas RrgB incluyen variantes de la SEQ ID NO: 174. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 174. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o

más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 174 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 174. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.

5 Otros polipéptidos RrgB preferentes para su uso con la invención comprenden una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con la SEQ ID NO: 175; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 'n' aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 175, en el que 'n' es 10 o más (por ejemplo, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250 o más). Estas proteínas RrgB incluyen variantes de la SEQ ID NO: 175. Algunos fragmentos de (b) preferentes comprenden un epítipo de la SEQ ID NO: 175. Otros fragmentos preferentes carecen de uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo C-terminal y/o uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) desde el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 175 a la vez que retienen al menos un epítipo de la SEQ ID NO: 175. Otros fragmentos omiten uno o más dominios de la proteína.

RrgC

15 RrgC es una de las subunidades de superficie del pilus neumocócico [79, 80]. Para fines de referencia, la secuencia de aminoácidos de RrgC es la SEQ ID NO: 176 en el presente documento.

Polipéptidos híbridos

20 Los antígenos neumocócicos usados en la invención pueden estar presentes en la composición como polipéptidos separados individuales. Cuando se usa más de un antígeno, sin embargo, no tienen que estar presentes como polipéptido separados. En su lugar, al menos dos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, o más) antígenos se pueden expresar como una sola cadena de polipéptidos (un polipéptido 'híbrido'). Algunos polipéptidos híbridos ofrecen dos ventajas principales: en primer lugar, un polipéptido que puede ser inestable o está poco expresado por sí mismo puede ser asistido mediante adición de un compañero híbrido adecuado que supera el problema; en segundo lugar, la fabricación comercial está simplificada como si fuera necesario usar solamente una expresión y purificación para producir dos polipéptidos que ambos de los cuales son antigénicamente útiles.

25 El polipéptido híbrido puede comprender dos o más secuencias de polipéptidos del primer grupo de antígenos. El polipéptido híbrido puede comprender una o más secuencias de polipéptidos del primer grupo de antígenos y una o más secuencias de polipéptidos del segundo grupo de antígenos. El polipéptido híbrido puede comprender una o más secuencias de polipéptidos del primer grupo de antígenos y una o más secuencias de polipéptidos del tercer grupo de antígenos. El polipéptido híbrido puede comprender una o más secuencias de polipéptidos del segundo grupo de antígenos y una o más secuencias de polipéptidos del tercer grupo de antígenos. El polipéptido híbrido puede comprender dos o más secuencias de polipéptidos del séptimo grupo de antígenos. El polipéptido híbrido puede comprender dos o más secuencias de polipéptidos del octavo grupo de antígenos. El polipéptido híbrido puede comprender dos o más secuencias de polipéptidos del noveno grupo de antígenos. El polipéptido híbrido puede comprender dos o más secuencias de polipéptidos del décimo grupo de antígenos. Además, el polipéptido híbrido puede comprender dos o más secuencias de polipéptidos de cada uno de los antígenos enumerados anteriormente, o dos o más variantes del mismo antígeno en los casos en los que la secuencia tiene una variabilidad parcial entre cepas.

40 Los híbridos que consisten en secuencias de aminoácidos de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez antígenos neumocócicos son útiles. En particular, los híbridos que consisten en secuencias de aminoácidos de dos, tres, cuatro, o cinco antígenos neumocócicos son preferentes, tales como dos o tres antígenos neumocócicos.

45 Algunos polipéptidos híbridos diferentes se pueden mezclar en conjunto en una sola formulación. Los antígenos híbridos se pueden combinar con antígenos no híbridos seleccionados entre el primer, segundo o tercer grupos de antígenos. Dentro de tales combinaciones, un antígeno neumocócico puede estar presente en más de un polipéptido híbrido y/o como un polipéptido no híbrido. Sin embargo, es preferente que un antígeno esté presente ya sea como un híbrido o como un no híbrido, pero no como ambos.

Los polipéptidos híbridos también se pueden combinar con antígenos conjugados o no neumocócicos como se ha descrito anteriormente.

50 Algunos polipéptidos híbridos se pueden representar con la fórmula $\text{NH}_2\text{-A}\{-\text{X-L-}\}_n\text{-B-COOH}$, en la que: X es una secuencia de aminoácidos de un antígeno neumocócico, como se ha descrito anteriormente; L es una secuencia de aminoácidos de engarce adicional; A es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional; B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional; n es un número entero de 2 o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, etc.). Normalmente, n es 2 o 3.

55 Si un resto -X- tiene una secuencia de péptidos líder en su forma de tipo silvestre, éste se puede incluir u omitir en la proteína híbrida. En algunas realizaciones, se puede producir de delección de los péptidos líder excepto para el del resto -X- situado en el extremo N-terminal de la proteína híbrida, es decir, el péptido líder de X₁ será retenido, pero los péptidos líder de X₂ ... X_n serán omitidos. Esto es equivalente a la delección de todos los péptidos líder y al uso del

péptido líder de X₁ como resto -A-.

Para cada n casos de {-X-L-}, la secuencia de aminoácidos de engarce -L- puede estar presente o ausente. Por ejemplo, cuando $n = 2$, el híbrido puede NH₂-X₁-L₁-X₂-L₂-COOH, NH₂-X₁-X₂-COOH, NH₂-X₁-L₁-X₂-COOH, NH₂-X₁-X₂-L₂-COOH, etc. La secuencias de aminoácidos de engarce -L- por lo general serán cortas (por ejemplo, 20 o menos aminoácidos, es decir, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Algunos ejemplos comprenden secuencias de péptidos cortas que facilitan la clonación de, engarces de poli-glicina (es decir, que comprenden Gly _{n} en la que $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o superior), y etiquetas de histidina (es decir, His _{n} en la que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o superior). Otras secuencias de aminoácidos de engarce adecuadas serán evidentes para los expertos en la materia. Un engarce útil es GSGGGG (SEQ ID NO: 232) o GSGSGGGG (SEQ ID NO: 233), con el dipéptido Gly-Ser estando formado a partir de un sitio de restricción BamHI, de este modo ayuda a la clonación y la manipulación, y siendo el tetrapéptido (Gly)₄ un engarce de poli-glicina habitual. Otros engarces adecuados, en particular para uso como el L _{n} final son un dipéptido de Leu-Glu o la SEQ ID NO: 235.

-A- es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional. Por lo general, ésta será corta (por ejemplo, 40 o menos aminoácidos, es decir, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Algunos ejemplos incluyen secuencias líder para dirigir el tráfico de proteínas, o secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o la purificación (por ejemplo, etiquetas de histidina, es decir, His _{n} en la que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o superior). Otras secuencias de aminoácidos N-terminales adecuadas serán evidentes para los expertos en la materia. Si X₁ carece de su propio extremo de metionina N-terminal, -A- es preferentemente un oligopéptido (por ejemplo, con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 aminoácidos) que proporciona un extremo de metionina N-terminal, por ejemplo Met-Ala-Ser, o un solo resto de Met.

-B- es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional. Por lo general, ésta será corta (por ejemplo, 40 o menos aminoácidos, es decir, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1). Algunos ejemplos incluyen secuencias para dirigir el tráfico de proteínas, secuencias peptídicas cortas que facilitan la clonación o la purificación (por ejemplo, que comprenden etiquetas de histidina, es decir, His _{n} en la que $n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ o superior, tal como la SEQ ID NO: 234), o secuencia se aumentan la estabilidad de la proteína. Otras secuencias de aminoácidos C-terminales adecuadas serán evidentes para los expertos en la materia.

Algunos ejemplos de híbridos incluyen polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en: spr2021-spr0057 (por ejemplo, SEQ ID NO: 193); spr2021-spr0096 (por ejemplo, SEQ ID NO: 194); spr2021-spr0565 (por ejemplo, SEQ ID NO: 195 o SEQ ID NO: 196 o SEQ ID NO: 197); spr2021-RrgA (por ejemplo, SEQ ID NO: 198); spr0057-spr2021 (por ejemplo, SEQ ID NO: 199); spr0057-spr0096 (por ejemplo, SEQ ID NO: 200); spr0057-RrgA (por ejemplo, SEQ ID NO: 201); spr0057-spr0565 (por ejemplo, SEQ ID NO: 202 o SEQ ID NO: 203 o SEQ ID NO: 204); spr0096-spr2021 (por ejemplo, SEQ ID NO: 205); spr0096-spr0057 (por ejemplo, SEQ ID NO: 206); spr0096-RrgA (por ejemplo, SEQ ID NO: 207); spr0096-spr0565 (por ejemplo, SEQ ID NO: 208 o SEQ ID NO: 209 o SEQ ID NO: 210); RrgA-spr2021 (por ejemplo, SEQ ID NO: 211); RrgA-spr0565 (por ejemplo, SEQ ID NO: 212 o SEQ ID NO: 213 o SEQ ID NO: 214); RrgA-spr0057 (por ejemplo, SEQ ID NO: 215); RrgA-spr0096 (por ejemplo, SEQ ID NO: 216); spr0565-spr0057 (por ejemplo, SEQ ID NO: 217 o SEQ ID NO: 218 o SEQ ID NO: 219); spr0565-spr0096 (por ejemplo, SEQ ID NO: 220 o SEQ ID NO: 221 o SEQ ID NO: 222); spr0565-spr2021 (por ejemplo, SEQ ID NO: 223 o SEQ ID NO: 224 o SEQ ID NO: 225); o spr0565-RrgA (por ejemplo, SEQ ID NO: 226 o SEQ ID NO: 227 o SEQ ID NO: 228).

Polipéptido usado con la invención

Los polipéptidos usados con la invención pueden tomar diversas formas (por ejemplo, nativa, fusiones, glicosilado, no glicosilado, lipidado, no lipidado, fosforilado, no fosforilado, miristoilado, no miristoilado, monomérico, multimérico, en partículas, desnaturalizado, etc.).

Los polipéptidos usados con la invención se pueden preparar con diversos medios (por ejemplo, expresión recombinante, purificación a partir de cultivo celular, síntesis química, etc.). Las proteínas expresadas en forma recombinante son preferentes, en particular de polipéptidos híbridos.

Los polipéptidos usados con la invención se proporcionan preferentemente en forma purificada o sustancialmente purificada, es decir, sustancialmente libres de otros polipéptidos (por ejemplo, libres de polipéptidos de origen natural), en particular de otros estreptococos u otros polipéptidos de célula hospedadora, y por lo general tienen una pureza de al menos aproximadamente un 50 % (en peso), y normalmente una pureza de al menos aproximadamente un 90 %, es decir, inferior a aproximadamente un 50 %, y más preferentemente inferior a aproximadamente un 10 % (por ejemplo, 5 %) de una composición está compuesta por otros polipéptidos expresados. Por lo tanto, los antígenos en las composiciones se separan del organismo completo con el que se expresa la molécula.

Los polipéptidos usados con la invención son preferentemente polipéptidos neumocócicos.

El término "polipéptido" se refiere a polímeros de aminoácido de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados, y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también incluyen un polímero de aminoácido que se ha modificado por vía natural o mediante intervención;

por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación, o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de etiquetado. También están incluidos, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos se pueden producir como cadenas individuales o como cadenas asociadas.

La invención proporciona polipéptidos que comprenden una secuencia -P-Q- o -Q-P-, en la que: -P- es una secuencia de aminoácidos como se ha definido anteriormente y -Q- no es una secuencia como se ha definido anteriormente, es decir, la invención proporciona proteínas de fusión. Cuando el codón del extremo N-terminal de -P- no es ATG, pero este codón no está presente en el extremo N-terminal de un polipéptido, este se traducirá como el aminoácido convencional para ese codón en lugar de cómo una Met. Cuando este codón está en el extremo N-terminal de un polipéptido, sin embargo, este se traducirá como Met. Algunos ejemplos de restos -Q- incluyen, pero no se limitan a, etiquetas de histidina (es decir, His_n en la que n = 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o superior), proteína de unión a maltosa, o glutatión-S-transferasa (GST).

La divulgación también proporciona un procedimiento para producir un polipéptido de la invención, que comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora transformada con ácido nucleico de la invención en condiciones que inducen la expresión del polipéptido.

Aunque la expresión de los polipéptidos de la invención se puede producir en un *Streptococcus*, la invención normalmente usará un hospedador heterólogo para expresión (expresión recombinante). El hospedador heterólogo puede ser procarionta (por ejemplo, una bacteria) o eucariota. Puede ser *E. coli*, pero otros hospedadores adecuados incluyen *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholera*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria cinerea*, *Mycobacteria* (por ejemplo, *M. tuberculosis*), levaduras, etc. En comparación con los genes neumocócicos de tipo silvestre que codifican polipéptidos de la invención, el cambio de los codones es útil para optimizar la eficacia de la expresión en tales hospedadores sin afectar a los aminoácidos codificados.

La divulgación proporciona un procedimiento para producir un polipéptido de la invención, que comprende la etapa de sintetizar al menos parte del polipéptido por medios químicos. **Ácidos nucleicos**, La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican polipéptidos híbridos de la invención. También proporciona ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica uno o más polipéptidos híbridos de la invención.

La invención también proporciona ácidos nucleicos que comprenden secuencias de nucleótidos que tienen identidad de secuencias con tales secuencias de nucleótidos. La identidad entre secuencias se determina preferentemente con el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman como se ha descrito anteriormente. Tales ácidos nucleicos incluyen los que usan codones alternativos para codificar el mismo aminoácido.

La invención también proporcionar a los nucleicos que se pueden hibridar con estos ácidos nucleicos. Las reacciones de hibridación se pueden realizar en condiciones de diferente "rigurosidad". Las condiciones que aumentan la rigurosidad de una reacción de hibridación son acremente conocidas y publicadas en la técnica (por ejemplo, página 7.52 de la referencia 288). Algunos ejemplos de condiciones relevantes incluyen (con el fin de aumentar la rigurosidad): temperaturas de incubación de 25 °C, 37 °C, 50 °C, 55 °C and 68 °C; concentraciones de tampón de 10 x SSC, 6 x SSC, 1 x SSC, 0,1 x SSC (las que SSC es NaCl 0,15 M y tampón citrato 15 mM) y sus equivalentes usando otros sistemas de tampón; concentraciones de formamida de un 0 %, 25 %, 50 %, y un 75 %; tiempos de incubación de 5 minutos a 24 horas; 1, 2, o más etapas de lavado; tiempos de incubación de lavado de 1, 2, o 15 minutos; y soluciones de lavado de 6 x SSC, 1 x SSC, 0,1 x SSC, o agua desionizada. En la técnica se conocen bien algunas técnicas de hibridación y su optimización (por ejemplo, véanse las refs 82, 83, 288, 290, etc.).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico de la invención se hibridar con una diana en condiciones de baja rigurosidad; en otras realizaciones se hibrida en condiciones de rigurosidad intermedia; en realizaciones preferentes, se hibridar en condiciones de rigurosidad elevada. Un conjunto de condiciones de hibridación de baja rigurosidad a modo de ejemplo es 50 °C y 10 x SSC. Un conjunto de condiciones de hibridación de rigurosidad intermedia a modo de ejemplo es 55 °C y 1 x SSC. Un conjunto de condiciones de hibridación de rigurosidad elevada a modo de ejemplo es 68 °C y 0,1 x SSC.

La invención incluye secuencias de ácidos nucleicos que comprenden secuencias complementarias con estas secuencias (por ejemplo, para anti-sentido o sondeo, o para uso como cebadores).

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar en reacciones de hibridación (por ejemplo, transferencias de Northern o Southern, o en micromatrices de ácidos nucleicos o 'chips genéticos') y reacciones de amplificación (por ejemplo, PCR, SDA, SSSR, LCR, TMA, NASBA, etc.) y otras técnicas de ácido nucleico.

El ácido nucleico de acuerdo con la invención puede tomar diversas formas (por ejemplo, una sola hebra, dos hebras, vectores, cebadores, sondas, etiquetado, etc.). Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser circulares o ramificados, pero por lo general serán lineales. A menos que se especifique o se requiera de otro modo, cualquier realización de la invención que use un ácido nucleico puede usar tanto la forma de doble hebra como cada una de las dos formas de una hebra complementarias que pueden componer la forma de una hebra. Por lo general, los

cebadores y las sondas son de una hebra, al igual que lo son los ácidos nucleicos antisentido. Los ácidos nucleicos de la invención se proporcionan preferentemente en forma purificada o sustancialmente purificada, es decir, sustancialmente libre de otros ácidos nucleicos (por ejemplo, libre de ácidos nucleicos de origen natural), en particular de otros ácidos nucleicos de neumococos o célula hospedadora, que por lo general tienen una pureza de al menos aproximadamente un 50 % (en peso), y normalmente una pureza de al menos aproximadamente un 90 %. Los ácidos nucleicos de la invención son preferentemente ácidos nucleicos neumocócicos.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden preparar de muchas maneras, por ejemplo, mediante síntesis química (por ejemplo, síntesis de ADN con fosforamidita) total o parcialmente, mediante digestión de ácidos nucleicos más largos usando nucleasas (por ejemplo, enzimas de restricción), mediante la unión de ácidos nucleicos o nucleótidos más cortos (por ejemplo, usando ligasas o polimerasas), a partir de bibliotecas genómicas o de ADNc, etc.

El ácido nucleico de la invención se puede unir a un soporte sólido (por ejemplo, una perla, placa, filtro, película, portaobjetos, soporte de micromatriz, resina, etc.). El ácido nucleico de la invención se puede etiquetar, por ejemplo, con una etiqueta radiactiva o fluorescente, o una etiqueta de biotina. Esto es particularmente útil cuando el ácido nucleico se va a usar en técnicas de detección, por ejemplo, cuando el ácido nucleico es un cebador o como una sonda.

El término "ácido nucleico" incluyen en términos generales una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que contienen desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o sus análogos. Este incluye ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN. También incluye análogos de ADN o ARN, tales como los que contienen estructuras principales modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o fosforotioatos) o bases modificadas. Por lo tanto, la invención incluye ARNm, ARNt, ARNr, ribozimas, ADN, ADNc, ácidos nucleicos recombinantes, ácidos nucleicos ramificados, plásmidos, vectores, sondas, cebadores, etc. Cuando el ácido nucleico de la invención adquiere la forma de ARN, puede tener o no una protección en la posición 5'.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser parte de un vector, es decir, parte de una construcción de ácido nucleico diseñada para transducción/transfección de uno o más tipos de células. Los vectores pueden ser, por ejemplo, "vectores de clonación" que se diseñan para aislamiento, propagación y replicación de nucleótidos insertados, "vectores de expresión" que se diseñan para expresión de una secuencia de nucleótidos en una célula hospedadora, "vectores virales" que se diseñan para dar como resultado la producción de un virus recombinante o partículas similar a un virus, o "vectores lanzadera", que comprenden los atributos de más de un tipo de vector. Algunos vectores preferentes son plásmidos. Una "célula hospedadora" incluye una célula individual o cultivo celular que puede ser o que tiene un receptor de ácido nucleico exógeno. Algunas células hospedadoras incluyen progenie de una sola célula hospedadora, y puede que no sea necesario que la progenie sea completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN total) con la célula precursora original debido a mutación y/o cambio natural, accidental, o deliberado. Algunas células hospedadoras incluyen células transfectadas o infectadas *in vivo* o *in vitro* con el ácido nucleico de la invención.

Cuando un ácido nucleico es ADN, se observará que "U" en una secuencia de ARN se sustituirá por "T" en el ADN. De forma análoga, cuando un ácido nucleico es ARN, se observará que "T" en una secuencia de ADN se sustituirá por "U" en el ARN.

El término "complemento" o "complementario" cuando se usa en relación a ácidos nucleicos se refiere a emparejamiento de bases de Watson-Crick. Por lo tanto con el complemento de C es G, el complemento de G es C, el complemento de A es T (o U), y el complemento de T (o U) es A. también es posible usar bases tales como I (la purina inosina) por ejemplo para complementar las pirimidinas (C o T).

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar, por ejemplo: para producir polipéptidos; como sondas de hibridación para la detección de ácido nucleico en muestras biológicas; para generar copias adicionales de los ácidos nucleicos; para generar ribozimas u oligonucleótidos antisentido; como cebadores o sondas de ADN de una sola hebra; o como oligonucleótidos que forman tres hebras.

La divulgación proporciona un procedimiento para producir ácido nucleico de la invención, en el que el ácido nucleico se sintetiza en parte o totalmente usando medios químicos.

La divulgación proporciona vectores que comprenden en secuencias de nucleótidos de la invención (por ejemplo, vectores de clonación o expresión) y células hospedadoras transformadas con tales vectores.

La amplificación ácido nucleico puede ser cuantitativa y/o en tiempo real.

Para ciertas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos tienen una longitud preferentemente de al menos 7 nucleótidos (por ejemplo, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300 nucleótidos o superior).

Para ciertas realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos tienen una longitud preferentemente como máximo de 500 nucleótidos (por ejemplo, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15 nucleótidos o superior).

- 5 Algunos cebadores y sondas y otros ácidos nucleicos usados para hibridación, tienen una longitud preferentemente entre 10 y 30 nucleótidos (por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos).

Cepas y variantes

- 10 Los antígenos se han definido anteriormente por referencia a nomenclatura "spr". Esta nomenclatura se refiere a la numeración usada en la referencia 84 a la identificación única de marcos de lectura abiertos en la cepa R6 de *S. pneumoniae*. La secuencia de referencia básica para cualquier número de "spr" se puede encontrar fácilmente en bases de datos públicas de genes. Por ejemplo, el número de referencia de GenBank NC_003098 (GI: 15902044) es la secuencia del genoma de R6 completo (2.038.615 pb), y las secuencias de spr individuales se dan como entradas de "locus_etiqueta" en la sección "características" de la secuencia del genoma. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos para cualquier número de spr dado, y su secuencia de codificación natural, se puede establecer de forma inequívoca para la cepa R6. En las bases de datos también se dan algunas anotaciones funcionales.

- 15 La invención no se limita a secuencias de la cepa R6. Las secuencias del genoma de otras varias cepas de *S. pneumoniae* están disponibles, incluyendo las de 23F [85], 670 [86] y TIGR4 [87,88,89]. Se puede usar búsqueda y técnicas de alineamiento convencionales para identificar, en cualquiera de estas (u otras) secuencias de genoma adicionales, el homólogo de cualquier secuencia de spr en particular de R6. Además, las secuencias de R6 (y otras) disponibles se pueden usar para diseñar cebadores para amplificación de secuencias homólogas de otras cepas. Por lo tanto, la invención no se limita a las secuencias de R6, sino que más bien incluye tales variantes y homólogos de otras cepas de *S. pneumoniae*, así como variantes no naturales. En general, algunas variantes adecuadas de una SEQ ID NO en particular incluyen sus variantes alélicas, sus formas polimórficas, sus homólogos, sus ortólogos, sus parálogos, sus mutantes, etc.

- 20 Por lo tanto, por ejemplo, los polipéptidos usados con la invención pueden incluir, en comparación con la secuencia de referencia de R6, una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) instituciones de aminoácidos, tales como sustituciones conservativas (es decir, sustituciones de un aminoácido con otro que tiene una cadena lateral relacionada). Los aminoácidos genéticamente codificados por lo general se dividen en cuatro familias: (1) ácidos, es decir, aspartato, glutamato; (2) básicos, es decir, lisina, arginina, histidina; (3) no polares, es decir, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polares sin carga, es decir, glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. En ocasiones, fenilalanina, triptófano y tirosina se clasifican de manera conjunta como aminoácidos aromáticos. En general, la sustitución de aminoácidos individuales dentro de estas familias no tiene efecto principal en la actividad biológica. Los polipéptidos también pueden incluir una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) deleciones de un sólo aminoácido con respecto a las secuencias de R6. Los polipéptidos también pueden incluir una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, etc.) inserciones (por ejemplo, cada una de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos) con respecto a las secuencias de R6.

De forma análoga, un polipéptido usado con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que:

- 40 (a) es idéntica (es decir, idéntica en un 100 %) a una secuencia desvelada en el listado de secuencias;
 (b) comparte una identidad de secuencia (por ejemplo, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o superior) con una secuencia desvelada en el listado de secuencias;
 (c) tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 (o más) alteraciones de aminoácido individual (deleciones, inserciones, sustituciones), que pueden estar en posiciones separadas o pueden ser contiguas, en comparación con las secuencias de (a) o (b); y
 45 (d) cuando se alinean con una secuencia en particular del listado de secuencias usando un algoritmo de alineamiento por pares, cada ventana móvil de x aminoácidos del extremo N-terminal a C-terminal (tal como para un alineamiento que se extiende a p aminoácidos, en los que $p > x$, hay $p-x+1$ ventanas de este tipo) tiene al menos x aminoácidos alineados idénticos, en los que: x se selecciona entre 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200; y se selecciona entre 0,50, 0,60, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, 0,91, 0,92, 0,93, 0,94, 0,95, 0,96, 0,97, 0,98, 0,99; y si x y no es un número entero, entonces se redondea al alza al número entero más cercano. El algoritmo de alineamiento por pares preferente es el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch [90], usando parámetros por defecto (por ejemplo, con una penalización de apertura de Hueco = 10,0, y con una penalización de extensión de Hueco = 0,5, usando la matriz de puntuación EBLOSUM62). Este algoritmo se pone en marcha de forma conveniente en la herramienta *needle* en el paquete EMBOSS [91].

En la que se usan polipéptidos híbridos, los antígenos individuales dentro del híbrido (es decir, restos -X- individuales) pueden ser de una o más cepas. Cuando $n = 2$, por ejemplo, X_2 puede ser de la misma cepa que X_1 o de una cepa diferente. Cuando $n = 3$, las cepas pueden ser (i) $X_1 = X_2 = X_3$ (ii) $X_1 = X_2 \neq X_3$ (iii) $X_1 \neq X_2 = X_3$ (iv) $X_1 \neq X_2 \neq X_3$ o (v) $X_1 = X_3 \neq X_2$, etc.

Dentro del grupo (c), las deleciones o sustituciones se pueden producir en los extremos N-terminal y/o C-terminal, o pueden ser entre dos extremos. Por lo tanto, un truncamiento es un ejemplo de una deleción. Algunos truncamientos pueden implicar la deleción de hasta 40 (o más) aminoácidos en los extremos N-terminal y/o C-terminal.

- 5 En general, cuando un polipéptido de la invención comprende una secuencia que no es idéntica a una secuencia neumocócica completa del listado de secuencias (por ejemplo, cuando comprende un listado de secuencias con una identidad de secuencias < 100 % a la misma, o cuando comprende un fragmento de la misma) en cada caso individual es preferente que el polipéptido pueda hacer que un anticuerpo reconozca a la secuencia neumocócica completa.

Bacterias mutantes

- 10 La divulgación también proporciona un neumococo en el que uno o más de los antígenos de los diversos grupos de antígenos de la invención han experimentado una supresión genética. Se conocen bien algunas técnicas para producir bacterias con supresión genética, y se ha informado de neumococos con supresión genética. Una mutación por supresión genética se puede situar en la región de codificación del gen o puede permanecer dentro de sus regiones de control de la transcripción (por ejemplo, dentro de su promotor). Una mutación por supresión genética
15 reducirá el nivel de ARNm que codifica el antígeno a < 1 % del producido por la bacteria de tipo silvestre, preferentemente < 0,5 %, más preferentemente < 0,1 %, y lo más preferentemente a un 0 %.

- La divulgación también proporciona un neumococo en el que uno o más de los antígenos de los diversos grupos de antígenos de la invención tienen una mutación que inhibe su actividad. El gen que codifica el antígeno tendrá una mutación que cambia la secuencia de aminoácidos codificada. La mutación puede implicar de deleción, sustitución,
20 y/o inserción, cualquiera de las cuales puede implicar a uno o más aminoácidos.

Composiciones y medicamentos inmunogénicos

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden ser útiles como vacunas. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser profilácticas (es decir, para prevenir la infección) o terapéuticas (es decir, para tratar la infección), pero por lo general serán profilácticas.

- 25 Por lo tanto, las composiciones pueden ser farmacéuticamente aceptables. Normalmente incluirán componentes además de los antígenos, por ejemplo, por lo general incluyen uno o más vehículo(s) y/o excipiente(s) farmacéuticos. Una discusión minuciosa de tales componentes está disponible en la referencia 285.

- Por lo general, las composiciones se administrarán a un mamífero en forma acuosa. Antes de la administración, sin embargo, la composición puede haber estado en una forma no acuosa. Por ejemplo, aunque algunas vacunas se
30 fabrican en forma acuosa, a continuación se llenan y se distribuyen y se administran también en forma acuosa, se liofilizan durante la fabricación y se reconstituyen en una forma acua el momento de su uso. Por lo tanto, una composición puede estar seca, tal como una formulación liofilizada. La composición puede incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, es preferente, que la vacuna se presenten en forma sustancialmente libre (es decir, menos de 5 µg/ml) material de mercurio, por ejemplo, tiomersal. Las vacunas que no contienen
35 mercurio son más preferentes. Las vacunas sin conservantes son particularmente preferentes.

Para aumentar la estabilidad térmica, una composición puede incluir un agente protector de la temperatura. Algunos detalles adicionales de agentes de este tipo se proporcionan a continuación.

- Para controlar la tonicidad, es preferente incluir una sal fisiológica, tal como una sal sódica. El cloruro sódico (NaCl) es preferente, el cual puede estar presente entre 1 y 20 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 10 ± 2 mg/ml de
40 NaCl. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro potásico, dihidrogenofosfato potásico, fosfato disódico deshidratado, cloruro de magnesio, cloruro cálcico, etc.

Por lo general, las composiciones tendrán una osmolalidad entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg, y lo más preferentemente entrarán dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg.

- Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Algunos tampones habituales incluyen: un tampón de fosfato; un tampón de Tris; un tampón de borato; un tampón de succinato; un tampón de histidina (en particular con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón de citrato. Por lo general, algunos tampones estarán incluidos en el intervalo de 5-20 mM. El pH de una composición por lo general estará entre 5,0 y 8,1, y lo más habitualmente entre 6,0 y 8,0, por ejemplo, entre 6,5 y 7,5, o entre 7,0 y 7,8.

- La composición es preferentemente estéril. La composición es preferentemente no pirógena que contiene, por ejemplo, < 1 EU (unidad de endotoxina, como medida estándar) por dosis, y preferentemente < 0,1 EU por dosis. La composición está preferentemente libre de gluten.

La composición puede incluir material para una sola inmunización, o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (es decir, un kit de 'múltiples dosis'). La inclusión de un conservante que es preferente en organizaciones de múltiples dosis. Como una alternativa (o además) de incluir un conservante que en composiciones

de múltiples dosis, las composiciones pueden estar contenidas en un envase que tenga un adaptador aséptico para retirar el material.

Por lo general, las vacunas humanas se administran en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque una dosis media (es decir, aproximadamente 0,25 ml) se puede administrar a niños.

- 5 Las composiciones inmunogénicas de la invención también pueden comprender uno o más agentes inmunorreguladores. Preferentemente, uno o más de los agentes inmunorreguladores incluyen uno o más adyuvantes. Los adyuvantes pueden incluir un adyuvante de TH1 y/o una adyuvante de TH2, que se discute adicionalmente a continuación.

- 10 Los adyuvantes que se pueden usar en composiciones de la invención incluyen, pero no se limitan a: A. Composiciones que contienen minerales.

- 15 Algunas composiciones que contienen minerales adecuadas para uso como adyuvantes en la invención incluyen sales minerales, tales como sales de aluminio y sales de calcio (o mezclas de las mismas). Las sales de calcio incluyen fosfato cálcico (por ejemplo, las partículas "CAP" desveladas en la ref. 92). Las sales de aluminio incluyen hidróxidos, fosfatos, sulfatos, *etc.*, con las sales adoptando cualquier forma adecuada (por ejemplo, gel, cristalina, amorfa, *etc.*). La adsorción a estas sales es preferente. Las composiciones que contienen minerales también se pueden formular como una partícula de sal de metal [93].

- 20 Los adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio se pueden usar. Estos nombres son convencionales, pero se usan solamente por conveniencia, de que ninguno es una descripción precisa del compuesto químico real que está presente (por ejemplo, véase el capítulo 9 de la referencia 94)). La invención puede usar cualquier adyuvante de "hidróxido" o "fosfato" que en general se usan como adyuvantes. Los adyuvantes conocidos como "hidróxido de aluminio" por lo general son sales de oxihidróxido de aluminio, que normalmente son al menos parcialmente cristalinas. Los adyuvantes conocidos como "fosfato de aluminio" por lo general son hidroxifosfatos de aluminio, que a menudo también contienen una pequeña cantidad de sulfato (es decir, hidroxifosfato sulfato de aluminio). Estos se pueden obtener por precipitación, y las condiciones de reacción y las concentraciones durante la presentación influyen en el grado de sustitución de fosfato por hidroxilo en la sal.

- 25 Una morfología fibrosa (por ejemplo, como se observa en micrografías electrónicas de transmisión) es habitual para algunos adyuvantes de hidróxido de aluminio. El pl de los adyuvantes de hidróxido de aluminio es por lo general aproximadamente 11 es decir, el adyuvante por sí mismo tiene una carga superficial positiva a pH fisiológico. Se ha informado de capacidades de adsorción entre 1,8-2,6 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para algunos adyuvantes de hidróxido de aluminio.

- 30 Por lo general, los adyuvantes de fosfato de aluminio tienen una proporción molar de PO_4/Al entre 0,3 y 1,2, preferentemente entre 0,8 y 1,2, y más preferentemente 0,95 \pm 0,1. El fosfato de aluminio por lo general será amorfo, en particular para las sales de hidroxifosfato. Un adyuvante habitual es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar de PO_4/Al ratio entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg de Al^{3+}/ml . El fosfato de aluminio por lo general estará formado por partículas (por ejemplo, morfología similar a una placa como se observa en micrografías electrónicas de transmisión). Algunos diámetros habituales de las partículas están en el intervalo de 0,5-20 μm (por ejemplo, aproximadamente 5-10 μm) después de cualquier adsorción de antígeno. Se ha informado de capacidades de absorción entre 0,7-1,5 mg de proteína por mg de Al^{+++} a pH 7,4 para adyuvantes de fosfato de aluminio.

- 35 El punto de carga cero (PZC) del fosfato de aluminio está relacionado inversamente con el grado de sustitución de fosfato para hidroxilo, y este grado de sustitución puede variar dependiendo de las condiciones de reacción y concentración de reactivos usados para preparar las mediante precipitación. El PZC también se altera cambiando la concentración de iones fosfato piden solución (más fosfato = más PZC ácido) o por adición de un tampón tal como un tampón de histidina (hace el PZC más básico). Algunos fosfatos de aluminio usados de acuerdo con la invención por lo general tendrán un PZC entre 4,0 y 7,0, más preferentemente entre 5,0 y 6,5 por ejemplo aproximadamente 5,7. Algunas suspensiones de sales de aluminio usadas para preparar composiciones de la invención pueden contener un tampón (por ejemplo, un tampón de fosfato o uno de histidina o uno de Tris), pero esto no siempre es necesario. Las suspensiones son preferentemente estériles y sin pirógenos. Una suspensión puede incluir iones fosfato acuoso libres por ejemplo presentes a una concentración entre 1,0 y 20 mM, preferentemente entre 5 y 15 mM, y más preferentemente de aproximadamente 10 mM. Las suspensiones también pueden comprender cloruro sódico.

- 40 La invención puede usar una mezcla tanto de un hidróxido de aluminio como de un fosfato de aluminio. En este caso, puede haber más fosfato que hidróxido de aluminio por ejemplo una proporción de peso de al menos 2:1 por ejemplo $\geq 5:1$, $\geq 6:1$, $\geq 7:1$, $\geq 8:1$, $\geq 9:1$, *etc.*

- 45 La concentración de Al^{+++} en una composición para administración a un paciente es preferentemente inferior a 10 mg/ml por ejemplo ≤ 5 mg/ml, ≤ 4 mg/ml, ≤ 3 mg/ml, ≤ 2 mg/ml, ≤ 1 mg/ml, *etc.* Un intervalo preferente es entre 0,3 y 1 mg/ml. Una dosis máxima de 0,85 mg/dosis es preferente.

Los fosfatos de aluminio son particularmente preferentes, en particular en composiciones que incluyen un antígeno de sacárido de *H. influenzae*, y un adyuvante habitual es hidroxifosfato de aluminio amorfo con una proporción molar de PO_4/Al entre 0,84 y 0,92, incluida a 0,6 mg de Al^{3+} /ml. La adsorción con una dosis baja de fosfato de aluminio se puede usar por ejemplo 50 y 100 μg de Al^{3+} por conjugado por dosis. Cuando en una composición hay más de un conjugado, no es necesario que todos los conjugados se adsorban.

B. Emulsiones oleosas

Algunas composiciones de emulsión oleosa adecuadas para uso como adyuvantes en la invención incluyen emulsiones de escualeno-agua, tales como MF59 [Capítulo 10 de la ref. 94; véase también la ref. 95] (Escualeno al 5 %, Tween 80 al 0,5 %, y Span 85 al 0,5 %, formuladas en partículas submicrométricas usando a microfluidizador). También se puede usar adyuvante Completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA).

Se conocen diversos adyuvantes de emulsión de aceite en agua, y por lo general incluyen al menos un aceite y al menos un tensioactivo, con el aceite(s) y tensioactivo(s) siendo biodegradables (metabolizable) y biocompatibles. Las gotitas de aceite en la emulsión por lo general tienen un diámetro inferior a 5 μm , y de forma ideal tienen un diámetro submicrométrico, con estos tamaños pequeños consiguiéndose con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Las gotitas con un tamaño inferior a 220 nm son preferentes ya que se pueden someter a la esterilización con filtro.

La emulsión puede comprender aceites tales como los de una fuente animal (tal como pescado) o vegetal. Algunas fuentes de aceites vegetales incluyen nueces, semillas y granos. Algunos ejemplos, los más comúnmente disponibles, de frutos secos son aceite de cacahuete, aceite de semilla de soja, aceite de de coco y aceite de oliva. Por ejemplo, se puede usar el aceite de yoyoba se puede usar, obtenido de la semilla de yoyoba. Algunos aceites de semillas incluyen aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo y similares. En el grupo de los granos, el aceite de maíz es el más fácilmente disponible, también se puede usar el aceite de otros granos de cereales tales como trigo, avena, centeno, arroz, teff, triticual y similares. Algunos ésteres de ácidos grasos de 6-10 carbonos de glicerol y 1,2-propanodiol, aunque no son de origen natural en aceites de semillas, se pueden preparar por hidrólisis, separación y esterificación de los materiales apropiados partiendo de los aceites de frutos secos y de semillas. Algunas grasas y aceites de leche de mamífero se pueden metabolizar y por lo tanto se pueden usar en la práctica de la presente invención. Los procedimientos para la separación, purificación, saponificación y otros medios necesarios para obtener aceites puros de fuentes animales se conocen bien en la técnica. La mayoría de los pescados contienen aceites metabolizables que se puede recuperar fácilmente. Por ejemplo, del aceite de hígado de bacalao, aceites de hígado de tiburón, y aceite de ballena tal como esperma de ballena son algunos ejemplos de varios de los aceites de pescado que se pueden usar en el presente documento. Una serie de aceites de cadena ramificada se sintetizan de forma bioquímica en unidades de isopreno de 5 carbonos y por lo general se denominan terpenoides. El aceite de hígado de tiburón contiene terpenoides insaturados, ramificados, conocidos como escualeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, que es particularmente preferente en el presente documento. El escualano, el análogo saturado del escualeno, también es un aceite preferente. Algunos aceites de pescado, incluyendo escualeno y escualano, están disponibles fácilmente a partir de fuentes comerciales o se pueden obtener con procedimientos conocidos en la técnica. Otros aceites preferentes son los tocoferoles (véase a continuación). Se pueden usar algunas mezclas de aceites.

Los tensioactivos se pueden clasificar por su "HLB" (equilibrio hidrófilo/lipófilo). Los tensioactivos preferentes de la invención tienen un HLB de al menos 10, preferentemente al menos 15, y preferentemente al menos 16. La invención se puede usar con tensioactivos que incluyan, pero no se limitan a: los tensioactivos de ésteres de polioxietilén sorbitán (conocidos comúnmente como los Tweens), en especial polisorbato 20 y polisorbato 80; copolímeros de óxido de etileno (EO), óxido de propileno (PO), y/o óxido de butileno (BO), que se vende con el nombre comercial DOWFAX™, tales como copolímeros de bloque de EO/PO lineales; octoxinóles, que pueden variar en el número de grupos etoxi (oxi-1,2-etanodiol) de repetición, con octoxinol-9 (Triton X-100, o t-octilfenoxipolietoxietanol) siendo de interés en particular; (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL CA-630/NP-40); fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (lecitina); etoxilatos de nonilfenol, tales como la serie NP de Tergitol™; éteres grasos de poli-oxietileno derivados de alcoholes de laurilo, cetilo, estearilo y oleílo (conocidos como tensioactivos Brij), tal como monolauril trietilenglicol éter (Brij 30); ésteres de sorbitán (conocidos comúnmente como los SPAN), tales como trioleato de sorbitán (Span 85) y monolaurato de sorbitán. Los tensioactivos no iónicos son preferentes. Algunos tensioactivos preferentes para incluir en la emulsión son Tween 80 (monooleato de polioxietilén sorbitán), Span 85 (trioleato de sorbitán), lecitina y Triton X-100.

Se pueden usar algunas mezclas de agentes tensioactivos, por ejemplo, mezclas de Tween 80/Span 85. También es adecuada una combinación de un éster de polioxietilén sorbitán tales como monooleato de polioxietilén sorbitán (Tween 80) y un octoxinol tal como t-octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-100). Otra combinación útil comprende laureth 9 más un éster de polioxietilén sorbitán y/o un octoxinol.

Algunas cantidades de tensioactivos preferentes (% en peso) son: ésteres de polioxietilén sorbitán (tales como Tween 80) de un 0,01 a un 1 %, en particular aproximadamente un 0,1 %; octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (tales como Triton X-100, u otros detergentes en la serie Triton) de un 0,001 a un 0,1 %, en particular de un 0,005 a un 0,02 %; éteres de polioxietileno (tales como laureth 9) de un 0,1 a un 20 %, preferentemente de un 0,1 a un 10 % y

en particular de un 0,1 a un 1 % o aproximadamente un 0,5 %. Algunos adyuvantes de emulsión preferentes tienen un tamaño medio de las gotitas $< 1 \mu\text{m}$ por ejemplo $\leq 750 \text{ nm}$, $\leq 500 \text{ nm}$, $\leq 400 \text{ nm}$, $\leq 300 \text{ nm}$, $\leq 250 \text{ nm}$, $\leq 220 \text{ nm}$, $\leq 200 \text{ nm}$, o inferior. Estos tamaños de gotita se pueden conseguir de forma conveniente con técnicas tales como microfluidización.

- 5 Algunos adyuvantes de emulsión de aceite en agua específicos útiles con la invención incluyen, pero no se limitan a:
- Una emulsión submicrométrica de escualeno, Tween 80, y Span 85. La composición de la emulsión en volumen puede ser de aproximadamente un 5 % de escualeno, aproximadamente un 0,5 % de polisorbato 80 y aproximadamente un 0,5 % de Span 85. En términos de peso, estas proporciones se convierten en un 4,3 % de escualeno, un 0,5 % de polisorbato 80 y un 0,48 % de Span 85. Este adyuvante se conoce como 'MF59' [96-98], como se describe con más detalle en el Capítulo 10 de la ref. 99 y en el capítulo 12 de la ref. 100. De forma ventajosa, la emulsión de MF59 incluye iones de citrato, por ejemplo, tampón de citrato sódico 10 mM.
 - Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y polisorbato 80 (Tween 80). La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (por ejemplo, a 1 %) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener de un 2 a un 10 % de escualeno, de un 2 a un 10 % de tocoferol y de un 0,3 a un 3 % de Tween 80, y la proporción de peso de escualeno:tocoferol es preferentemente ≤ 1 ya que esta proporcióna una emulsión más estable. El escualeno y el Tween 80 pueden estar presentes en una proporción de volumen de aproximadamente 5:2 o en una proporción de peso de aproximadamente 11:5. Una emulsión de este tipo se puede fabricar por disolución de Tween 80 en PBS para dar una solución al 2 %, y a continuación mezclando 90 ml de esta solución con una mezcla de (5 g de DL- α -tocoferol y 5 ml de escualeno), y a continuación la mezcla se microfluidiza. La emulsión resultante puede tener gotitas de aceite submicrométricas por ejemplo con un diámetro medio entre 100 y 250 nm, preferentemente aproximadamente 180 nm. La emulsión también puede incluir un monofosforil lípido A 3-des-O-acilado (3d-MPL). Otra emulsión útil de este tipo puede comprender, por dosis humana, 0,5-10 mg de escualeno, 0,5-11 mg de tocoferol, y 0,1-4 mg de polisorbato 80 [101].
 - Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y un detergente de Triton (por ejemplo, Triton X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La emulsión también puede contener un tampón fosfato.
 - Una emulsión que comprende un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), un detergente de Triton (por ejemplo, Triton X-100) y un tocoferol (por ejemplo, un succinato de α -tocoferol). La emulsión puede incluir estos tres componentes a una proporción de masa de aproximadamente 75:11:10 (por ejemplo, 750 $\mu\text{g/ml}$ de polisorbato 80, 110 $\mu\text{g/ml}$ de Triton X-100 y 110 $\mu\text{g/ml}$ de succinato de α -tocoferol), y estas concentraciones deberían incluir cualquier contribución de estos componentes de los antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL (véase a continuación). La fase acuosa puede contener un tampón de fosfato.
 - Una emulsión de escualeno, polisorbato 80 y poloxámero 401 ("Pluronic™ L121"). La emulsión se puede formular en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4. Esta emulsión es un vehículo de administración útil para dipéptidos de muramilo, y se ha usado con treonil-MDP en el adyuvante "SAF-1" [102] (0,05-1 % de Thr-MDP, 5 % de escualeno, 2,5 % de Pluronic L121 y 0,2 % de polisorbato 80). También se puede usar sin el Thr-MDP, como en el adyuvante "AF" [103] (5 % de escualeno, 1,25 % de Pluronic L121 y 0,2 % de polisorbato 80). La microfluidización es preferente.
 - Una emulsión que comprende escualeno, un disolvente acuoso, un tensioactivo no iónico hidrófilo de polioxietilén alquil éter (por ejemplo, polioxietilén (12) cetostearil éter) y un tensioactivo no biónico hidrófobo (por ejemplo, un éster de sorbitán o éster de manida, tal como monoleato de sorbitán o 'Span 80'). La emulsión es preferentemente termorreversible y/o tiene al menos un 90 % de las gotitas de aceite (en volumen) con un tamaño inferior a 200 nm [104]. La emulsión también puede incluir uno o más de: alditol; un agente crioprotector (por ejemplo, un azúcar, tal como dodecilmaltósido y/o sacarosa); y/o un alquilpoliglicósido. La emulsión puede incluir un agonista de TLR4 [105]. Las emulsiones de este tipo se pueden liofilizar.
 - Una emulsión de escualeno, poloxámero 105 y Abil-Care [106]. La concentración final (peso) de estos componentes en vacunas con adyuvante tienen un 5 % de escualeno, un 4 % de poloxámero 105 (poliol de Pluronic) y un 2 % de Abil-Care 85 (Bis-PEG/PPG-16/16 PEG/PPG-16/16 dimeticona; triglicérido caprílico/cáprico).
 - Una emulsión que tiene un 0,5-50 % de un aceite, un 0,1-10 % de un fosfolípido, y un 0,05-5 % de un tensioactivo no iónico. Como se describe en la referencia 107, algunos componentes de fosfolípido preferentes son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidiglicerol, ácido fosfatídico, y esfingomielina y cardiolipina. Son ventajosos los tamaños de gotita submicrométricos.
 - Una emulsión de aceite en agua submicrométrica de un aceite no metabolizable (tal como aceite mineral ligero) y al menos un tensioactivo (tal como lecitina, Tween 80 o Span 80). Se pueden incluir algunos aditivos, tales como QuilA saponina, colesterol, un conjugado de saponina-lipófilo (tal como GPI-0100, que se describen la referencia 108, producido mediante la adición de amina alifática para desacilsaponina a través del grupo

carboxilo del ácido glucurónico), bromuro de dimetildioctadecilamonio y/o N,N-dioctadecil-N,N-bis(2-hidroxiethyl)propanodiamina.

- Una emulsión en la que una saponina (por ejemplo, QuilA o QS21) y un esteroles (por ejemplo, un colesterol) están asociados como micelas helicoidales [109].
- 5 • Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado lipófilo no iónico, y un tensioactivo hidrófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero de bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [110].
- Una emulsión que comprende un aceite mineral, un alcohol graso etoxilado hidroxilo no iónico, y un tensioactivo lipófilo no iónico (por ejemplo, un alcohol graso etoxilado y/o copolímero del bloque de polioxietileno-polioxipropileno) [110].

En algunas realizaciones, una emulsión se puede mezclar con un antígeno de forma extemporánea, en el momento de la administración, y por lo tanto el adyuvante y el antígeno se pueden mantener por separado en una vacuna envasada o distribuida, lista para formulación final en el momento de su uso. En otras realizaciones, una emulsión se mezcla con antígeno durante la fabricación, y por lo tanto la composición se basa en un líquido con forma adyuvante. Por lo general, el antígeno estará en una forma acuosa, de modo que la vacuna se prepara por último mediante mezcla de dos líquidos. La proporción de volumen de los dos líquidos para mezclar puede variar (por ejemplo, entre 5:1 y 1:5) pero por lo general es aproximadamente 1:1. Cuando las concentraciones de los componentes se proporcionan en las descripciones de emulsiones específicas mencionadas anteriormente, estas concentraciones son por lo general para una composición sin diluir, y por lo tanto, la concentración después de mezclar con una solución de antígeno disminuirá.

Quando una composición incluye un tocoferol, se puede usar cualquiera de los tocoferoles α , β , γ , δ , ϵ o ξ , pero los α -tocóferoles son preferentes. El tocoferol puede tomar varias formas, por ejemplo, sales y/o isómeros diferentes. Algunas sales incluyen sales orgánicas, tales como succinato, acetato, nicotinato, etc. Se puede usar tanto D- α -tocóferol como DL- α -tocóferol. Algunos tocoferoles están incluidos en vacunas de forma ventajosa para uso en pacientes de mayor edad (por ejemplo, con edades de 60 años o superiores) porque se ha informado que la vitamina E tiene un efecto positivo en la respuesta inmune en este grupo de pacientes [111]. También tienen propiedades antioxidantes que pueden ayudar a estabilizar las emulsiones [112]. Un α -tocóferol preferente es el DL- α -tocóferol, y la sal preferente de este tocoferol es el succinato. Se ha encontrado que la sal de succinato cooperar con ligandos relacionados con el TNF *in vivo*.

30 C. Formulaciones de saponina [capítulo 22 de la ref. 94]

Algunas formulaciones de saponina también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Las saponinas son un grupo heterogéneo de glucósidos de esteroles y glucósidos de triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, brotes, raíces e incluso flores de una amplia gama de especies vegetales. La saponina de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como adyuvante. La saponina también se puede tener en el mercado a partir de *Smilax ornata* (zarzaparrilla), *Gypsophilla paniculata* (velo de la novia), y *Saponaria officinalis* (raíz de jabón). Algunas formulaciones de adyuvante de saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones de lípido, tales como los ISCOM. QS21 se comercializa como Stimulon™.

Algunas composiciones de saponinas se han purificado usando HPLC y RP-HPLC. Se han identificado algunas fracciones políticas específicas usando estas técnicas, incluyendo QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. Un procedimiento de producción de QS21 se desvela en la ref. 113. Algunas formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroles, tal como colesterol [114].

Algunas combinaciones de saponinas y colesteroles se pueden usar para formar partículas únicas denominadas complejos de inmunoestimulación (ISCOM) [capítulo 23 de la ref. 94]. Por lo general, los ISCOM también incluyen un fosfolípido tal como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina. Cualquier saponina conocida se puede usar en los ISCOM. Preferentemente, el ISCOM incluye uno o más de QuilA, QHA y QHC. Los ISCOM se describen adicionalmente en las refs. 114-116. Opcionalmente, los ISCOM pueden estar desprovistos de detergente adicional [117].

Una revisión del desarrollo de adyuvantes basados en saponina se puede encontrar en las refs. 118 y 119. D. Virosoomas y partículas similares a virus

50 Los virosomas y partículas similares al virus (VLP) también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Estas estructuras por lo general contienen una o más proteínas de un virus combinadas o formuladas opcionalmente con fosfolípido. Por lo general no son patógenas, no se replican y por lo general no contienen ninguno del genoma viral nativo. Las proteínas virales se pueden producir o aislar de forma recombinante a partir de virus completos. Estas proteínas virales adecuadas para uso en virosomas o VLP incluyen proteínas derivadas del virus de la gripe (tal como HA o NA), virus de la Hepatitis B (tales como proteínas del núcleo o cápside), virus de la Hepatitis E, virus del sarampión, virus Sindbis, Rotavirus, virus de la Fiebre Aftosa, retrovirus, virus de Norwalk, virus del papiloma humano, VIH, fagos de ARN, fago Q β (tales como proteínas de cubierta), fago GA, fago fr, fago AP205 y Ty (tal

como proteína p1 de retrotransposón Ty). Los VLP se discuten adicionalmente en las refs. 120-125. Los virosomas se discuten adicionalmente en, por ejemplo, la ref. 126.

E. Derivados bacterianos o microbianos

5 Algunos adyuvantes adecuados para su uso en la invención incluyen derivados bacterianos o microbianos tales como derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), derivados del lípido A, oligonucleótidos inmunoestimuladores y toxinas de ribosilación de ADP y derivados detoxificados de los mismos.

10 Algunos derivados no tóxicos de LPS incluyen monofosforil lípido A (MPL) y MPL 3-O-desacilado (3dMPL). El 3dMPL es una mezcla de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas. Una forma preferente de "partícula pequeña" de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado se desvela en la ref. 127. Tales "partículas pequeñas" de 3dMPL son lo suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22 µm [127]. Otros derivados de LPS no tóxicos incluyen miméticos de monofosforil lípido A, tales como derivados de fosfato de aminoalquil glucosaminida por ejemplo, RC-529 [128, 129].

Algunos derivados del lípido A incluyen derivados del lípido A de *Escherichia coli* Etal como OM-174. OM-174 se describe por ejemplo en las refs. 130 y 131.

15 Algunos oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen secuencias de nucleótidos que contienen un motivo CpG (una secuencia de dinucleótido que contiene una citosina no metilada unida por un enlace fosfato a una guanosina). También se ha demostrado que los ARN de doble hebra y oligonucleótidos que contienen secuencias palindrómicas o poli(dG) son inmunoestimuladores.

20 Los CpG pueden incluir modificaciones/análogos de nucleótidos tales como modificaciones de fosforotioato y pueden ser de doble hebra o de una sola hebra. Las referencias 132, 133 y 134 desvelan posibles sustituciones de análogo por ejemplo, solución de guanosina con 2'-desoxi-7-desazaguanosina. El efecto adyuvante de oligonucleótidos de CpG se discute adicionalmente en las refs. 135-140.

25 La secuencia de CpG se puede dirigir a TLR9, tal como el motivo GTCGTT o TTCGTT [141]. La secuencia de CpG puede ser específica para inducir una respuesta inmune de Th1, tal como un ODN de CpG-A, o puede ser más específica para inducir una respuesta de linfocitos B, al como ODN un de CpG-B. Los de ODN CpG-A y CpG-B se discuten en las refs. 142-144. Preferentemente, el CpG es un ODN de CpG-A. Preferentemente, el oligonucleótido CpG se construye de manera que el extremo en la posición 5' sea accesible para el reconocimiento del receptor. Opcionalmente, dos secuencias de oligonucleótidos CpG se pueden unir en sus extremos en la posición 3' para formar "inmunómeros". Véanse, por Ejemplo, las refs. 141 y 145-147.

30 Un adyuvante de CpG útil es CpG7909, también conocido como ProMune™ (Coley Pharmaceutical Group, Inc.). Otro CpG1826. Como alternativa, o además, para usar secuencias de CpG, se pueden usar secuencias de TpG [148], y estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos de CpG no metilados. El oligonucleótido inmunoestimulador puede ser rico en pirimidina. Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de timidina consecutivo (por ejemplo, TTTT, como se desvela en la ref. 148), y/o puede tener una composición de nucleótido con > 25 % de timidina (por ejemplo, > 35 %, > 40 %, > 50 %, > 60 %, > 80 %, etc.). Por ejemplo, puede comprender más de un nucleótido de citosina consecutivo (por ejemplo, CCCC, como se desvela en la ref. 148), y/o puede tener una composición de nucleótido con > 25 % de citosina (por ejemplo, > 35 %, > 40 %, > 50 %, > 60 %, > 80 %, etc.). Estos oligonucleótidos pueden estar libres de motivos de CpG no metilados. Por lo general, los oligonucleótidos inmunoestimuladores comprenden al menos 20 nucleótidos. Pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

35 40 Un adyuvante particularmente útil basado alrededor de oligonucleótidos inmunoestimuladores se conoce como IC-31™ [149]. Por lo tanto, 1 adyuvante usado con la invención puede comprender una mezcla de (i) un oligonucleótido (por ejemplo, entre 15-40 nucleótidos) incluyendo al menos un (y preferentemente múltiples) motivo de Cpl (es decir, una citosina unida a una inosina para formar un dinucleótido), y (ii) un polímero policatiónico, tal como un oligopéptido (por ejemplo, entre 5-20 aminoácidos) incluyendo al menos una (y preferentemente múltiples) secuencia(s) de tripéptido Lys-Arg-Lys. El oligonucleótido puede ser un desoxinucleótido que comprende la secuencia 5'-(IC)₁₃-3' de 26-mer (SEQ ID NO: 230). El polímero policatiónico puede ser un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos KKLKLLKLLK de 11-mer (SEQ ID NO: 231). El oligonucleótido y el polímero pueden formar complejos como se desvela, por ejemplo, en las referencias 150 y 151.

45 50 En la invención se pueden usar toxinas bacterianas de ribosilación de ADP y derivados detoxificados de las mismas como adyuvantes. Preferentemente, la proteína se deriva de *E. coli* (enterotoxina lábil al calor "LT" de *E. coli*), cólera ("CT"), o pertussis ("PT"). El uso de toxinas de ribosilación de ADP detoxificadas como adyuvantes mucosales se describe en la ref. 152 y como adyuvantes parenterales en la ref. 153. La toxina o toxoide se encuentra preferentemente en forma de una holotoxina, que comprende subunidades tanto A como B. Preferentemente, la subunidad A contiene una mutación detoxificante; preferentemente la subunidad B no está mutada. 55 Preferentemente, el adyuvante es un mutante de LT detoxificado tal como LT-K63, LT-R72, y LT-G192. El uso de toxinas de ribosilación de ADP y derivados detoxificados de las mismas, en particular LT-K63 y LT-R72, como adyuvantes se puede encontrar en las refs. 154-161. Un mutante de CT útil es o CT-E29H [162]. La referencia numérica para sustituciones de aminoácidos se basa preferentemente en los alineamientos de las subunidades A y

B de las toxinas de ribosilación de ADP establecidas en la ref. 163.

F. Inmunomoduladores Humanos

5 Algunos inmunomoduladores humanos adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen citoquinas, tales como interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12 [164], etc.) [165], interferones (por ejemplo, interferón- γ), factor de estimulación de colonias de macrófagos, y factor de necrosis tumoral. Un inmunomodulador preferente es IL-12.

G. Bioadhesivos y Mucoadhesivos

10 Algunos bioadhesivos y mucoadhesivos también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Algunos bioadhesivos adecuados incluyen microesferas de ácido hialurónico esterificadas [166] o mucoadhesivos tales como derivados reticulados de poli(ácido acrílico), alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, polisacáridos y carboximetilcelulosa. El quitosano y derivados del mismo también se pueden usar como adyuvantes en la invención [167].

H. Micropartículas

15 Algunas micropartículas también se pueden usar como adyuvantes en la invención. Las micropartículas (es decir, una partícula de ~100 nm a ~150 μ m de diámetro, más preferentemente de ~200 nm a ~30 μ m de diámetro, y lo más preferentemente de ~500 nm a 10 μ m de diámetro) formadas a partir de materiales que son biodegradables y no tóxicos (por ejemplo, un poli(α -hidroxiácido), un ácido polihidroxiбутírico, un poliortoéster, un polianhídrido, una policaprolactona, etc.), con poli(lactida-co-glicólido) son preferentes, tratados opcionalmente para tener una superficie con carga negativa (por ejemplo, con SDS) o una superficie con carga positiva (por ejemplo, con un detergente catiónico, tal como CTAB).

I. Liposomas (Capítulos 13 y 14 de la ref. 94)

Algunos ejemplos de formulaciones de liposomas adecuadas para uso como adyuvantes se describen en las refs. 168-170.

J. Formulaciones de polioxietilen éter y éster de polioxietileno

25 Algunos adyuvantes adecuados para uso en la invención incluyen polioxietilen éteres y ésteres de polioxietileno [171]. Tales formulaciones incluyen adicionalmente tensioactivos de éster de polioxietileno y sorbitán en combinación con un octoxinol [172] así como tensioactivos de polioxietilen alquil éteres o éster en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional tal como un octoxinol [173]. Algunos polioxietilen éteres preferentes se seleccionan entre el siguiente grupo: polioxietilen-9-lauril éter (laureth 9), polioxietilen-9-esteoril éter, polioxietilen-8-esteoril éter, polioxietilen-4-lauril éter, polioxietilen-35-lauril éter, y polioxietilen-23-lauril éter.

K. Fosfacenos

Se puede usar un fosfaceno, tal como poli[di(carboxilatofenoxi)fosfaceno] ("PCPP") como se describe, por ejemplo, en las referencias 174 y 175.

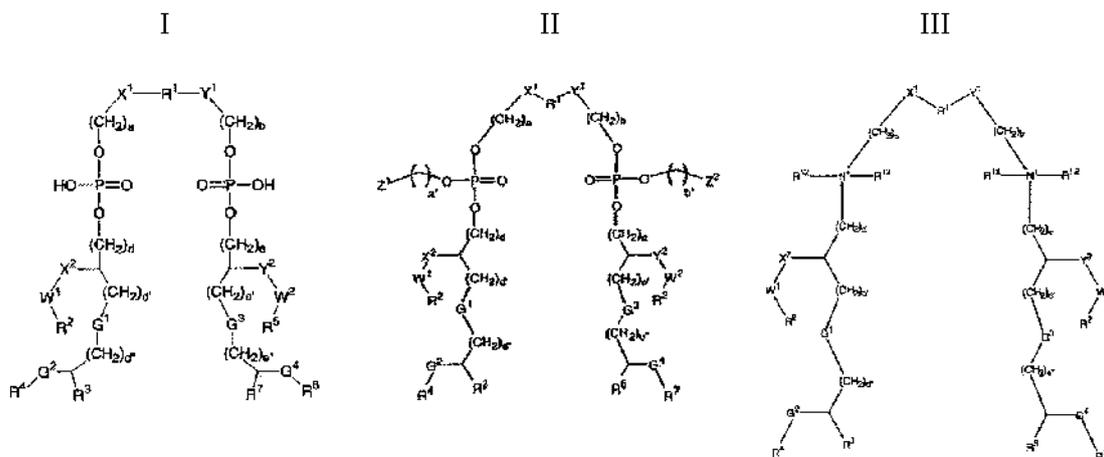
L. Péptidos de muramilo

35 Algunos ejemplos de péptidos muramilo adecuados para uso como adyuvantes en la invención incluyen N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (nor-MDP), y N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxi-fosforiloxi)-etilamina (MTP-PE). M. Compuestos de imidazoquinolona.

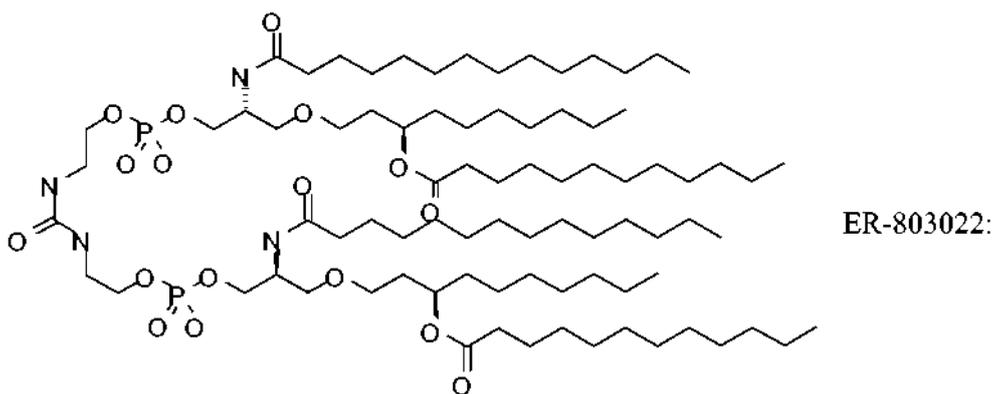
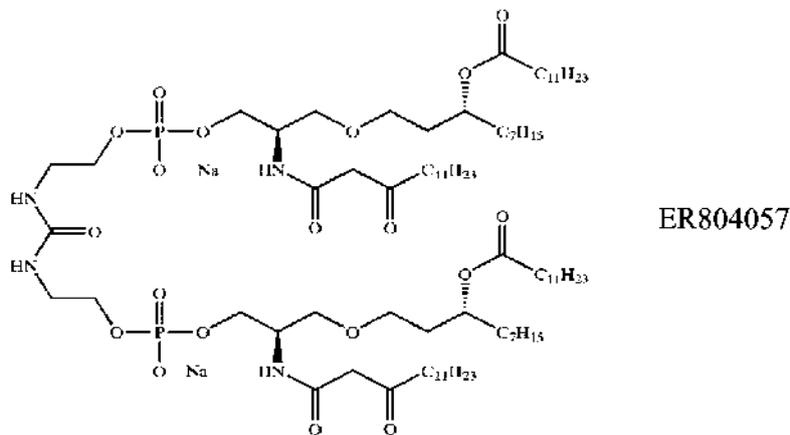
40 Algunos ejemplos de compuestos de imidazoquinolona adecuados para uso con adyuvantes en la invención incluyen Imiquimod ("R-837") [176,177], Resiquimod ("R-848") [178], y sus análogos; y sales de los mismos (por ejemplo, las sales de clorhidrato). Algunos detalles adicionales sobre imidazoquinolinas inmunoestimuladoras se pueden encontrar en las referencias 179 a 183.

N. Ureas sustituidas

Algunas ureas sustituidas útiles como adyuvantes incluyen compuestos de fórmula I, II o III, o sales de los mismos:



como se definen la referencia 184, tales como 'ER 803058', 'ER 803732', 'ER 804053', ER 804058', 'ER 804059', 'ER 804442', 'ER 804680', 'ER 804764', ER 803022 o 'ER 804057', por ejemplo:



5 **O. Adyuvantes adicionales**

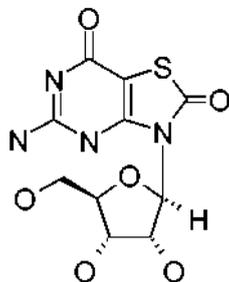
Algunos adyuvantes adicionales que se pueden usar con la invención incluyen:

- Un derivado de fosfato de aminoalquil glucosaminida, tal como RC-529 [185,186].
- Un compuesto de tiosemicarbazona, tal como los que se desvelan en la referencia 187. Algunos procedimientos para formular, fabricar e identificar sistemáticamente compuestos activos también se describen en la referencia 187. Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- α .
- Un compuesto de tripantrina, tal como los que se desvelan en la referencia 188. Algunos procedimientos para formular, fabricar e identificar sistemáticamente compuestos activos también se describen en la referencia 188.

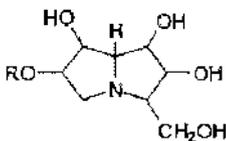
10

Las tiosemicarbazonas son particularmente eficaces en la estimulación de células mononucleares de sangre periférica humana para la producción de citoquinas, tales como TNF- α .

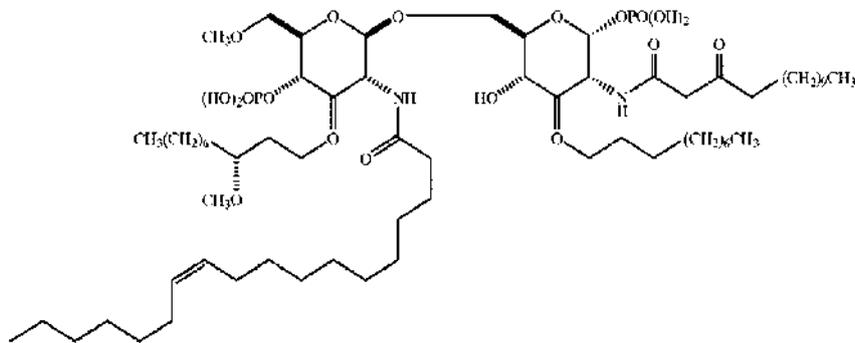
- Un análogo de nucleósido, tal como: (a) Isatorabina (ANA-245; 7-tia-8-oxoguanosina):



- 5 y profármacos de la misma; (b) ANA975; (c) ANA-025-1; (d) ANA380; (e) los compuestos desvelados en las referencias 189 a 191 Loxoribina (7-alil-8-oxoguanosina) [192].
- Compuestos desvelados en la referencia 193, incluyendo: compuestos de Acilpiperazina, compuestos de Indoldiona, compuestos de Tetrahidroisquinolina (THIQ), compuestos de Benzociclodiona, compuestos de Aminoazavinilo, compuestos de Aminobenzimidazol quinolinona (ABIQ) [194,195], compuestos de Hidraftalamida, compuestos de Benzofenona, compuestos de Isoxazol, compuestos de Esterol, compuestos de Quinazolinona, compuestos de Pirrol [196], compuestos de Antraquinona, compuestos de Quinoxalina, compuestos de Triazina, compuestos de Pirazalopirimidina, y compuestos de Benzazol [197].
 - Compuestos que contienen lípidos unidos a una estructura principal acíclica que contiene fosfato, tal como el antagonista de TLR4, E5564 [198,199]:
 - 15 • Un polímero de polioxidonio [200,201] u otro derivado de polietilen-piperazina N-oxidado.
 - 5'-Monofosfato de metil inosina ("MIMP") [202].
 - Un compuesto de pirrolizidina polihidroxilada [203], tal como una que tiene la fórmula:



- 20 en la que R se selecciona entre el grupo que comprende hidrógeno, grupos acilo, alquilo (por ejemplo, cicloalquilo), alqueno, alquino y arilo lineales o ramificados, sin sustituir o sustituidos, saturados o insaturados, o una sal farmacéuticamente aceptable o derivado de los mismos. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a: casuarina, casuarina-6- α -D-glucopiranososa, 3-*epi*-casuarina, 7-*epi*-casuarina, 3,7-*diepi*-casuarina, *etc.*
- Un ligando de CD1d, tal como una α -glicosilceramida [204-211] (por ejemplo, α -galactosilceramida), α -glicosilceramidas que contienen fitoesfingosina, OCH, KRN7000 [(2S,3S,4R)-1-O-(α -D-galactopiranosil)-2-(N-hexacosanoilamino)-1,3, 4-octadecanotriol], CRONY-101, 3"-O-sulfo-galactosilceramida, *etc.*
 - 25 • Una gamma inulina [212] o derivado de la misma, tal como algamulina.



Combinaciones de adyuvante

- 30 La invención también puede comprender combinaciones de aspectos de uno o más de los adyuvantes identificados anteriormente. Por ejemplo, en la invención se pueden usar las siguientes composiciones de adyuvante: (1) una saponina y una emulsión de aceite en agua [213]; (2) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no

tóxico (por ejemplo, 3dMPL) [214]; (3) una saponina (por ejemplo, QS21) + un derivado de LPS no tóxico (por ejemplo, 3dMPL) + un colesterol; (4) una saponina (por ejemplo, QS21) + 3dMPL + IL-12 (opcionalmente + un esteroide) [215]; (5) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite en agua [216]; (6) SAF, que contiene un 10 % de escualeno, un 0,4 % de Tween 80™, un 5 % de polímero L121 Pluronic de bloque, y thr-MDP, ya sea microfluidizado en una emulsión submicrométrica o sometido a agitación vorticial para generar una emulsión de tamaño de partícula mayor. (7) sistema de adyuvante Ribit™ (RAS), (Ribi Immunochem) que contiene un 2 % de escualeno, un 0,2 % de Tween 80, y uno o más componentes de la pared celular bacteriana del grupo que consiste en monofosforilípido A (MPL), dimicolato de trehalosa (TDM), y esqueleto de pared celular (CWS), preferentemente MPL + CWS (Detox™); y (8) una o más sales minerales (tal como una sal de aluminio) + un derivado no tóxico de LPS (tal como 3dMPL).

Otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimuladores se desvelan en el capítulo 7 de la ref. 94.

El uso de un adyuvante de hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio es particularmente preferente, y por lo general los antígenos se adsorben a estas sales. El fosfato cálcico es otro adyuvante preferente. Otras combinaciones de adyuvante preferentes incluyen combinaciones de adyuvantes de Th1 y Th2 tales como CpG y alum o resiquimod y alum. Se puede usar una combinación de fosfato de aluminio y 3dMPL, ya que se ha informado que esta es eficaz en la inmunización neumocócica [325]. Las composiciones de la invención pueden provocar tanto una respuesta inmune mediada por células así como una respuesta inmune humoral. Esta respuesta inmune inducirá preferentemente anticuerpos de larga duración (por ejemplo, neutralización) y una inmunidad mediada por células que puede responder rápidamente después de exposición a neumococos.

Por lo general, se cree que para iniciar y/o aumentar la inmunidad mediada por células y la inmunidad humoral son necesarios dos tipos de linfocitos T, linfocitos CD4 y CD8. Los linfocitos T CD8 pueden expresar un co-receptor CD8 y normalmente se denominan linfocitos T Citotóxicos (CTL). Los linfocitos T CD8 son capaces de reconocer o interactuar con antígenos presentados en moléculas de Clase I de MHC.

Los linfocitos T CD4 pueden expresar un co-receptor CD4 y normalmente se denominan linfocitos T auxiliares. Los linfocitos T CD4 son capaces de reconocer péptidos antigénicos unidos a moléculas de la clase II de MHC. Después de la interacción con una molécula de la clase II de MHC, los linfocitos CD4 pueden secretar factores tales como citoquinas. Estas citoquinas secretadas pueden activar los linfocitos B, linfocitos T citotóxicos, macrófagos, y otras células que participan en una respuesta inmune. Los linfocitos T auxiliares o linfocitos CD4⁺ se pueden dividir adicionalmente en dos subconjuntos funcionalmente distintos: fenotipo TH1 y fenotipos TH2 que se diferencian en su función de citoquina y efectora.

Los linfocitos TH1 activados aumentan la inmunidad celular (incluyendo un aumento de la producción de CTL específico de antígeno) y por lo tanto, tienen un valor en la respuesta a infecciones intracelulares. Los linfocitos TH1 activados pueden secretar uno o más de IL-2, IFN- γ , y TNF- β . Una respuesta inmune de TH1 puede dar como resultado reacciones inflamatorias locales por activación de macrófagos, linfocitos NK (citotóxicos naturales), y linfocitos T CD8 citotóxicos (CTL). Una respuesta inmune de TH1 también puede actuar para ampliar la respuesta inmune mediante estimulación del crecimiento de los linfocitos B y T con IL-12. Los linfocitos B estimulados con TH1 pueden secretar IgG2a.

Los linfocitos TH2 activados aumentan la producción de anticuerpos y por lo tanto tienen valor en la respuesta a infecciones extracelulares. Los linfocitos TH2 activados pueden secretar uno o más de IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10. Una respuesta inmune de TH2 puede dar como resultado la producción de IgG1, IgE, IgA y linfocitos B de memoria para protección en el futuro.

Un aumento de la respuesta inmune puede incluir uno o más de un aumento de la respuesta inmune de TH1 y una respuesta inmune de TH2.

Una respuesta inmune de TH1 puede incluir uno o más de un aumento de los CTL, un aumento de una o más citoquinas asociadas con una respuesta inmune de TH1 (tal como IL-2, IFN- γ , y TNF- β), un aumento de los macrófagos activados, un aumento de la actividad de NK, o un aumento de la producción de IgG2a. Preferentemente, el aumento de la respuesta inmune de TH1 incluirá un aumento de la producción de IgG2a.

Una respuesta inmune de TH1 se puede provocar usando un adyuvante de TH1. Por lo general, un adyuvante de TH1 provocará un aumento de los niveles de producción de IgG2a con respecto a la inmunización del antígeno sin adyuvante. Algunos adyuvantes de TH1 adecuados para uso en la invención pueden incluir por ejemplo formulaciones de saponina, virosomas y partículas similares a virus, derivados no tóxicos de lipopolisacárido enterobacteriano (LPS), oligonucleótidos inmunoestimuladores. Algunos oligonucleótidos inmunoestimuladores, tales como oligonucleótidos que contienen un motivo de CpG, son adyuvantes de TH1 preferentes para uso en la invención.

Una respuesta inmune de TH2 puede incluir uno o más de un aumento de una o más de las citoquinas asociadas con una respuesta inmune de TH2 (tal como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10), o un aumento de la producción de IgG1, IgE, IgA y linfocitos B de memoria. Preferentemente, el aumento de la respuesta inmune de TH2 incluirá un aumento de la producción de IgG1.

Una respuesta inmune de TH2 se puede provocar usando una adyuvante de TH2. Por lo general, un adyuvante de TH2 provocará un aumento de los niveles de producción de IgG1 con respecto a inmunización del antígeno sin adyuvante. Algunos adyuvantes de TH2 adecuados para uso en la invención incluyen, por ejemplo, composiciones que contienen minerales, emulsiones oleosas, y toxinas de ribosilación de ADP y derivados detoxificados de los mismos. Algunas composiciones que contienen minerales, tales como sales de aluminio, son adyuvantes de TH2 preferentes para uso en la invención.

Preferentemente, la invención incluye una composición que comprende una combinación de un adyuvante de TH1 y un adyuvante de TH2. Preferentemente, una composición de este tipo provoca un aumento de TH1 y un aumento de la respuesta de TH2, es decir, un aumento de la producción tanto de la producción de IgG1 como de IgG2a con respecto a la inmunización sin un adyuvante. Aún más preferentemente, la composición que comprende una combinación de un adyuvante de TH1 y de TH2 provoca un aumento de la respuesta inmune de TH1 y/o un aumento de la respuesta inmune de TH2 con respecto a la inmunización con un solo adyuvante (es decir, con respecto a la inmunización con un adyuvante de TH1 solo o una inmunización con un adyuvante de TH2 solo).

La respuesta inmune puede ser una o ambas de una respuesta inmune de TH1 y una respuesta de TH2. Preferentemente, la respuesta inmune proporciona uno o ambas de un aumento de la respuesta de TH1 y un aumento de la respuesta de TH2.

El aumento de la respuesta inmune puede ser una o ambos de una respuesta inmune sistémica o una mucosal. Preferentemente, la respuesta inmune proporciona una o ambas de un aumento de la respuesta inmune sistémica y un aumento de la respuesta inmune mucosal. Preferentemente, la respuesta inmune mucosal es una respuesta inmune de TH2. Preferentemente, la respuesta inmune mucosal incluye un aumento de la producción de IgA.

Algunas infecciones neumocócica as pueden afectar a diversas zonas del organismo y por lo tanto las composiciones de la invención se pueden reparar en diversas formas. Por ejemplo, las composiciones se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas. También se pueden preparar algunas formas sólidas adecuadas para solución en, o suspensión en, vehículos líquidos antes de inyección (por ejemplo, una composición liofilizada o una composición liofilizada por pulverización). La composición se puede preparar para administración tópica por ejemplo como una pomada, crema o polvo. La composición se puede preparar para administración oral por ejemplo como un comprimido o cápsula, como una pulverización o como un jarabe (opcionalmente con sabor). La composición se puede preparar para administración por vía pulmonar por ejemplo como un inhalador, usando un polvo fino o una pulverización. La composición se puede preparar como un supositorio o supositorio vaginal. La composición se puede preparar para administración nasal, auricular u ocular por ejemplo en forma de gotas. La composición puede estar en forma de kit, diseñado de una forma tal que una composición combinada se reconstituye justo antes de su administración a un paciente. Tales kits pueden comprender uno o más antígenos en forma líquida y uno o más antígenos liofilizados.

Cuando una composición se va a preparar de forma extemporánea antes de su uso (por ejemplo, cuando un componente está presente en forma liofilizada) y está presente como un kit, el kit puede comprender dos viales, o puede comprender una jeringa de llenado rápido y un vial, con los contenidos de la jeringa siendo usados para reactivar los contenidos del vial antes de la inyección.

Algunas composiciones inmunogénicas usadas como vacunas comprenden una cantidad inmunológicamente eficaz de antígeno(s), así como cualquier otro componente, si fuera necesario. Por 'cantidad inmunológicamente eficaz', se hace referencia a que la administración de esa cantidad a un individuo, ya sea de una sola dosis o como parte de una serie, es eficaz para tratamiento o prevención. Esta cantidad varía dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, edad, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primate no humano, primate, etc.), la capacidad del sistema inmune del individuo para sintetizar anticuerpos, el grado de protección deseado, la formulación de la vacuna, la evaluación del médico tratante de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la cantidad entre en un intervalo relativamente amplio que se pueda determinar a través de ensayos de rutina. Cuando en una composición se incluye más de un antígeno, entonces los dos antígenos pueden estar presentes en la misma dosis que entre sí o a diferentes dosis.

Como se ha mencionado anteriormente, una composición puede incluir un agente protector de la temperatura, y este componente puede ser particularmente útil en composiciones de adyuvante (en particular las que contienen un adyuvante mineral, tal como una sal de aluminio). Como se describe en la referencia 217, un agente protector de la temperatura líquido se puede añadir a una composición de vacuna acuosa para disminuir su punto de congelación, por ejemplo, para reducir el punto de congelación hasta por debajo de 0 °C. Por lo tanto, la composición se puede almacenar a una temperatura inferior a 0 °C, pero superior a la de su punto de congelación, para inhibir la descomposición térmica. El agente protector de la temperatura también permite la congelación de la composición, a la vez que protege a los adyuvantes de sal mineral frente a la aglomeración o sedimentación después de congelación y descongelación, y también puede proteger a la composición de temperaturas elevadas superiores a, por ejemplo, 40 °C. Una vacuna acuosa de partida y el agente de protección de la temperatura líquido se pueden mezclar de un modo tal que el agente de protección de la temperatura del líquido forme un 1-80 % en volumen de la mezcla final. Los agentes protectores de la temperatura adecuados deberían ser seguros para administración humana, fácilmente miscibles/solubles en agua, y no deberían dañar a otros componentes (por ejemplo, antígeno y

adyuvante) en la composición. Algunos ejemplos incluyen glicerina, propilenglicol, y/o polietilenglicol (PEG). Los PEG adecuados pueden tener un peso molecular medio que varía de 200-20.000 Da. En una realización preferente, el polietilenglicol puede tener un peso molecular medio de aproximadamente 300 Da ('PEG-300').

5 La invención proporciona una composición inmunogénica que comprende: (i) uno o más antígeno(s) seleccionados entre el primer, segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno o décimo grupos de antígenos; y (ii) un agente de protección de la temperatura. Esta composición se puede formar mezclando (i) una composición acuosa que comprende uno o más antígeno(s) seleccionados entre el primer, segundo, tercero, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno o décimo grupos de antígenos, con (ii) un agente protector de la temperatura. A
10 continuación, la mezcla se puede almacenar a una temperatura inferior a, por ejemplo, 0 °C, de 0-20 °C, de 20-35 °C, de 35-55 °C, o superior, se puede almacenar en forma líquida o congelada. La mezcla se puede liofilizar. Como alternativa, la composición se puede formar mezclando (i) una composición seca que comprende uno o más antígeno(s) seleccionados entre el primer, segundo, tercer, cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno o décimo grupos de antígenos, con (ii) una composición líquida que comprende el agente de protección de la temperatura. Por lo tanto, el componente (ii) se puede usar para reconstituir el componente (i).

15 **Procedimientos de tratamiento y administración de la vacuna**

La invención también proporciona una composición inmunogénica de la invención para su uso en un procedimiento para aumentar una respuesta inmune en un mamífero. La respuesta inmune es preferentemente protectora preferentemente y preferentemente implica inmunidad mediada por anticuerpos y/o células. El procedimiento puede aumentar una respuesta de estimulación.

20 La invención también proporciona al menos dos antígenos de la invención para su uso combinado como un medicamento, por ejemplo, para uso para aumentar una respuesta inmune en un mamífero.

La invención también proporciona los al menos dos antígenos de la invención para su uso en la preparación de un medicamento para aumentar una respuesta inmune en un mamífero.

25 Con el aumento de una respuesta inmune en el mamífero con estos usos y procedimientos, el mamífero se puede proteger frente a la infección neumocócica. Más particularmente, el mamífero se puede proteger frente a meningitis neumocócica. La invención es eficaz frente a neumococos de diversos serotipos diferentes, pero puede ser particularmente útil para proteger frente a enfermedades que resultan de infección neumocócica por cepas en los serotipos 1, 5, 6 y 19A.

30 La divulgación también proporciona un kit que comprende un primer componente y un segundo componente en el que ninguno del primer componente ni del segundo componente es una composición de la invención como se ha descrito anteriormente, pero en el que el primer componente y el segundo componente se pueden combinar para proporcionar una composición de la invención como se ha descrito anteriormente. El kit puede incluir adicionalmente un tercer componente que comprende uno o más de los siguientes: instrucciones, jeringa u otro dispositivo de administración, adyuvante, o solución de formulación farmacéuticamente aceptable.

35 La divulgación también proporciona un dispositivo de administración cargado previamente con una composición inmunogénica de la invención.

40 El mamífero es preferentemente un ser humano. Cuando la vacuna es para uso profiláctico, el ser humano es preferentemente un niño (por ejemplo, un bebé que gatea o niño pequeño) o un adolescente; cuando la vacuna es para uso terapéutico, el ser humano es preferentemente un adolescente o un adulto. Una vacuna destinada para niños también se puede administrar a adultos para evaluar, por ejemplo, la seguridad, dosificación, inmunogenicidad, etc.

45 Una manera de comprobar la eficacia del tratamiento terapéutico implica el control de la infección neumocócica después de administración de las composiciones. Una manera de comprobar la eficacia del tratamiento profiláctico implica el control de respuestas inmunes, por vía sistémica (tal como controlando el nivel de producción de IgG1 e IgG2a) y/o por vía mucosal (tal como controlando el nivel de producción de IgA), frente a los antígenos en las composiciones de la invención después de administración de la composición. Por lo general, algunas respuestas de anticuerpos de suero específico de antígeno se determinan después de la inmunización pero antes de la estimulación mientras que algunas respuestas mucosales específicas de antígeno se determinan después de la inmunización y después de la estimulación.

50 Otra manera de evaluar la inmunogenicidad de las composiciones de la presente invención es expresar las proteínas de forma recombinante para identificación sistemática de sueros de paciente o secreciones mucosales mediante inmunotransferencia y/o micromatrices. Una reacción positiva ante la proteína y la muestra del paciente indica que el paciente ha superado una respuesta inmune a la proteína en cuestión. Este procedimiento también se puede usar para identificar antígenos y/o epítomos inmunodominantes dentro de los antígenos.

55 La eficacia de las composiciones de vacuna también se puede determinar *in vivo* mediante estimulación de modelos animales de infección neumocócica, por ejemplo, cobayas o ratones, con las composiciones de vacuna. Un modelo

de este tipo se describe en la referencia 218.

5 Por lo general, las composiciones de la invención se administrarán directamente a un paciente. La administración directa se puede conseguir mediante inyección (por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, o al espacio intersticial de un tejido), o por vía mucosal, tal como mediante administración rectal, oral (por ejemplo, comprimido, inhalación), vaginal, tópica, transdérmica o transcutánea, intranasal, ocular, auricular, pulmonar u otra administración mucosal.

Las composiciones de la invención se pueden usar para provocar inmunidad sistémica y/o mucosal, preferentemente para provocar un aumento de la inmunidad sistémica y/o mucosal.

10 Preferentemente, el aumento de la inmunidad sistémica y/o mucosal se refleja en un aumento de la respuesta inmune de TH1 y/o TH2. Preferentemente, el aumento de las tres de incluye un aumento de la producción de IgG1 y/o IgG2a y/o IgA.

15 La dosificación se puede realizar mediante un programa de una sola dosis o un programa de múltiples dosis. Las dosis múltiples se pueden usar en un programa de inmunización primaria y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de dosis múltiple, las diversas dosis se pueden administrar con la misma ruta o con rutas diferentes, por ejemplo una sensibilización parenteral y un refuerzo mucosal, una sensibilización mucosal y con refuerzo parenteral, etc. Las dosis múltiples por lo general se administrarán con una separación de al menos 1 semana (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, etc.).

20 Las vacunas de la invención pueden ser para uso en el tratamiento tanto de niños como de adultos. Por lo tanto un paciente humano puede tener menos de 1 años de edad, 1-5 años de edad, 5-15 años de edad, 15-55 años de edad, o al menos 55 años de edad. Algunos pacientes preferentes para recibir las vacunas son las personas de mayor edad (por ejemplo, ≥ 50 años de edad, ≥ 60 años de edad, y preferentemente ≥ 65 años de edad), los jóvenes (por ejemplo, ≤ 5 años de edad), pacientes hospitalizados, trabajadores sanitarios, servicio armado y personal militar, mujeres embarazadas, los pacientes enfermos crónicos o inmunodeficiencias. Las vacunas no son únicamente adecuadas para estos grupos y, sin embargo, se pueden usar de forma más general en una población.

25 Las vacunas producidas por la invención se pueden administrar a pacientes sustancialmente al mismo tiempo que (por ejemplo, durante la misma consulta o visita médica a un profesional sanitario o centro de vacunación) otras vacunas, por ejemplo sustancialmente al mismo tiempo que la vacuna para el sarampión, una vacuna para paperas, una vacuna para rubeola, una vacuna de MMR, una vacuna para varicela, una vacuna para MMRV, una vacuna para difteria, una vacuna para tétanos, una vacuna para pertussis, una vacuna para DTP, una vacuna de tipo b para *H. influenzae* conjugada, una vacuna inactivada para poliovirus, una vacuna para virus de la hepatitis B, una vacuna conjugada meningocócica (tal como una vacuna AC-W135-Y tetravalente), una vacuna para virus respiratorio sincitial, etc.

35 **Inmunización mucosal**

La invención proporciona una composición inmunogénica que comprende (i) un antígeno de polipéptido de la invención. La invención también proporciona una composición inmunogénica de la invención para uso en un procedimiento para aumentar una respuesta inmune en un mamífero. La composición se administra preferentemente por vía mucosal (a una superficie mucosal) por ejemplo, se puede administrar por vía intranasal.

40 El antígeno de polipéptido puede ser, por ejemplo, parte del séptimo grupo de antígenos. El antígeno de polipéptido puede ser un antígeno de pilus, tal como un polipéptido RrgA o RrgB.

La toxina del componente (i) se puede derivar, por ejemplo, de enterotoxina lábil al calor de *E. coli* ("LT"). El derivado puede tener una mutación detoxificante en sus subunidad A, por ejemplo, puede ser LT-K63 o LT-R72.

45 La administración intranasal de un polipéptido RrgB y un adyuvante de LT-K63 es preferente. En ratones, se ha mostrado que esto disminuye la carga bacteriana de una cepa neumocócica invasiva en la nasofaringe, pulmones y sangre y proporciona un aumento de 5 veces de la tasa de supervivencia.

Inmunización con ácido nucleico

50 Las composiciones inmunogénicas descritas anteriormente incluyen antígenos de polipéptidos de neumococos. En todos los casos, sin embargo, los antígenos de polipéptido se pueden sustituir por ácidos nucleicos (por lo general ADN) que codifican esos polipéptidos, para dar composiciones, procedimientos y usos basados en inmunización con ácido nucleico. La inmunización con ácido nucleico es en la actualidad un campo desarrollado (por ejemplo, véanse las referencias 219 a 226, etc.), y se ha aplicado vacunas neumocócicas (por ejemplo, ref. 227).

El ácido nucleico que codifica el inmunógeno se expresa *in vivo* después de administración a un paciente y a continuación el inmunógeno expresado estimula el sistema inmune. El principio activo por lo general tomará la forma

de un vector de ácido nucleico que comprende: (i) un promotor; (ii) una secuencia que codifica el inmunógeno, unido de forma operativa al promotor; y opcionalmente (iii) un marcador seleccionable. Algunos vectores preferentes pueden comprender adicionalmente (iv) un origen de replicación; y (v) un terminado de la transcripción cadena abajo de y unido de forma operativa a (ii). En general, (i) y (v) serán eucariotas y (iii) y (iv) serán procariotas.

- 5 Algunos promotores preferentes son promotores virales por ejemplo de citomegalovirus (CMV). El vector también puede incluir secuencias de regulación de la transcripción (por ejemplo, potenciadores) además del promotor y que interactúan de forma funcional con el promotor. Algunos vectores preferentes incluyen el potenciador/promotor de CMV inmediato-temprano, y algunos vectores más preferentes también incluyen el intrón A de CMV. El promotor se une de forma operativa a una secuencia cadena abajo que codifica un inmunógeno, de modo que la expresión de la
- 10 secuencia que codifica al inmunógeno está bajo el control del promotor.

Cuando se usa un marcador, éste funciona preferentemente en un hospedador microbiano (por ejemplo, en un procariota, en una bacteria, en una levadura). El marcador es preferentemente un marcador seleccionable procariota (por ejemplo, transcrito bajo el control de un promotor procariota). Por conveniencia, algunos marcadores habituales son genes de resistencia a antibióticos.

- 15 El vector de la invención es preferentemente un vector episómico o extracromosómico de replicación de forma autónoma, tal como un plásmido.

El vector de la invención comprende preferentemente un origen de replicación. Es preferente que el origen de replicación sea activo en procariotas pero no en eucariotas.

- 20 Por lo tanto, algunos vectores preferentes incluyen un marcador procariota para selección del vector, un origen de replicación procariota, pero un promotor *eucariota* para conducir la transcripción de la secuencia que codifica al inmunógeno. Por lo tanto, los vectores (a) estarán amplificados y seleccionados en hospedadores procariotas sin expresión de polipéptido, pero (b) estarán expresados en hospedadores eucariotas sin amplificación. Esta disposición es ideal para vectores de inmunización de ácido nucleico.

- 25 El vector de la invención puede comprender una secuencia determinación de la transcripción eucariota cadena abajo de la secuencia de codificación. Esto puede aumentar los niveles de transcripción. Cuando la secuencia de codificación no tiene su propio, el vector de la invención comprende preferentemente una secuencia de poliadenilación. Una secuencia de poliadenilación preferente es de la hormona de crecimiento bovina.

El vector de la invención puede comprender un sitio de clonación múltiple.

- 30 Además de las secuencias que codifican el inmunógeno y un marcador, el vector puede comprender una segunda secuencia de codificación eucariota. El vector cambio puede comprender IRES cadena arriba de dicha segunda secuencia para permitir la traducción de un segundo polipéptido eucariota del mismo transcrito que el inmunógeno. Como alternativa, la secuencia que codifica el inmunógeno puede estar cadena abajo de un IRES.

- 35 El vector de la invención puede comprender motivos de CpG sin metilar por ejemplo secuencias de ADN sin metilar que tienen en común una citosina que precede a una guanosina, flanqueada por dos purinas en la posición 5' y dos pirimidinas en la posición 3'. En sus formas sin metilar, se ha demostrado que estos motivos de ADN son potentes estimuladores de varios tipos de células inmunes. Algunos vectores se pueden administrar de una manera dirigida. Algunas técnicas de administración de ADN mediadas por receptor se describen, por ejemplo, en las referencias 228 a 233. Las composiciones terapéuticas que contienen un ácido nucleico se administran en un intervalo de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 200 mg de ADN para administración local en un protocolo de terapia
- 40 genética. La concentración varía de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 2 µg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 500 µg, y de aproximadamente 200 µg a aproximadamente 100 µg de ADN también se pueden usar durante un protocolo de terapia genética. Algunos factores tales como un procedimiento de acción (por ejemplo, para aumentar o inhibir los niveles del producto genético codificado) y eficacia de transformación y expresión son consideraciones que influirán en la dosificación necesaria para una última eficacia. Cuando se desea una mayor expresión en una zona de tejido más grande, a cantidades más grandes de vector o las mismas cantidades se volverán a administrar en un protocolo de administraciones sucesivo, o pueden ser necesarias varias administraciones a diferentes partes del tejido adyacentes o cercanas para obtener resultados terapéuticos positivos. En todos los casos, la experimentación de rutina en ensayos clínicos determinará intervalos específicos para efecto terapéutico óptimo.

- 50 Los vectores se pueden administrar usando vehículos de administración genética. El vehículo de administración genética puede ser de un origen viral o no viral (por lo general, véanse las referencias 234 a 237).

- 55 En la técnica se conocen bien algunos vectores basados en virus para la administración y expresión de un ácido nucleico deseado en una célula deseada. Algunos vehículos basados en virus a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan, retrovirus recombinantes (por ejemplo, referencias 238 a 248), vectores basados en virus alfa (por ejemplo, vectores de virus Sindbis, virus del bosque Semliki (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), virus del Río Ross (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) y virus de la encefalitis equina venezolana (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR 1249; ATCC VR-532); también se pueden usar híbridos o quimeras de estos virus), vectores de virus de la

viruela (por ejemplo, vaccinia, viruela aviar, viruela del canario, vaccinia Ankara modificado, etc.), vectores de adenovirus, y virus adeno-asociados (AAV) (por ejemplo, véanse las refs. 249-254). También se puede usar la administración de ADN ligado a adenovirus muertos [255].

5 También se pueden usar algunos vehículos y procedimientos de administración que incluyen, pero no se limitan a, ADN condensado policatiónico unido o no unido a adenovirus muerto solo [por ejemplo 255], ADN ligado a ligando [256], células de vehículos de administración de células eucariotas [por ejemplo, las refs. 257-261] y neutralización de carga nucleica o fusión con membranas celulares. También se puede usar ADN desnudo. Algunos procedimientos de introducción de ADN desnudo a modo de ejemplo se describen en las refs. 262 y 263. Los liposomas (por ejemplo, inmunoliposomas) que pueden actuar como vehículos de administración de genes se describen en las refs. 264 a 268. Otros enfoques se describen en las referencias 269 y 270.

15 La administración no viral adicional adecuada para uso incluye sistemas de administración mecánica tales como el enfoque que se describe en la ref. 270. Por otra parte, la secuencia de codificación y el producto de expresión de este tipo se puede administrar a través de deposición de materiales de hidrogel fotopolimerizados o el uso de radiación ionizante [por ejemplo, las refs 271 y 272]. Otros procedimientos convencionales para administración genética que se pueden usar para administrar la secuencia de codificación incluyen, por ejemplo, el uso de la pistola de partículas de transferencia genética portátil [273] o el uso de radiación ionizante para activar genes transferidos [271 y 272]. La administración de ADN usando micropartículas de PLG {poli (lactida-co-glicólido)} es un procedimiento particularmente preferente, por ejemplo, por adsorción a las micropartículas, que opcionalmente se tratan para que tengan una superficie con carga negativa (por ejemplo, tratadas con SDS) o una superficie con carga positiva (por ejemplo, tratadas con un detergente catiónico, tal como CTAB).

Anticuerpos

Algunos anticuerpos frente a antígenos neumocócicos se pueden usar para inmunización pasiva [274]. Por lo tanto, la divulgación proporciona un anticuerpo que es específico para un antígeno en el primer, segundo o tercer grupos de antígenos. La divulgación también proporciona un anticuerpo que es específico para un antígeno en el cuarto, quinto, sexto, séptimo, octavo, noveno o décimo grupos de antígenos. La divulgación también proporciona el uso de tales anticuerpos en terapia. La divulgación también proporciona el uso de tales anticuerpos en la fabricación de un medicamento. La divulgación también proporciona un procedimiento para tratar un mamífero que comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención. Como se ha descrito anteriormente para composiciones inmunogénicas, estos procedimientos y cursos permiten proteger a un mamífero frente a infección neumocócica.

El término "anticuerpo" incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, así como fragmentos de las mismas que son capaces de unirse a un antígeno. Estas incluyen moléculas de anticuerpo híbridas (quiméricas) [275, 276]; fragmentos de F(ab')₂ y F(ab) y moléculas de Fv; heterodímeros no covalentes [277, 278]; moléculas de Fv de una sola cadena (sFv) [279]; construcciones de fragmento de anticuerpo dimericas y triméricas; minicuerpos [280, 281]; moléculas de anticuerpo humanizado [282-284]; y cualquier fragmento funcional obtenido a partir de moléculas de este tipo, así como anticuerpos obtenidos a través de procedimientos no convencionales tales como presentación de fagos. Preferentemente, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales. Algunos procedimientos para obtener anticuerpos monoclonales se conocen bien en la técnica. Los anticuerpos humanizados o totalmente humanos son preferentes.

General

La práctica de la presente invención usará, a menos que se indique de otro modo, procedimientos convencionales de química, bioquímica, biología molecular, inmunología y farmacología, dentro de la experiencia en la materia. Tales técnicas se explican totalmente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, las referencias 285-292, etc.

45 La numeración "GI" se ha usado anteriormente. Un número GI, o "Identificador de GenInfo", es una serie de dígitos asignados de forma consecutiva a cada registro de secuencia procesado por el NCBI cuando se añaden secuencias a sus bases de datos. El número GI no tiene ninguna semejanza con el número de referencia del registro de la secuencia. Cuando una secuencia se actualiza (por ejemplo, para corrección, o para añadir más anotación o información) entonces, recibiendo el número de GI. Por lo tanto, la secuencia asociada con un número GI dado nunca se cambia.

50 Cuando la invención se refiere a un "epítipo", este epítipo puede ser un epítipo de linfocitos B y/o un epítipo de linfocitos T. Tales epítipos se pueden identificar de forma empírica (por ejemplo, usando PEPSCAN [293,294] o procedimientos similares), o se pueden predecir (por ejemplo, usando el índice antigénico de Jameson-Wolf [295], enfoques basados en matriz [296], MAPITOPE [297], TEPITOPE [298,299], redes neurales [300], OptiMer y EpiMer [301, 302], ADEPT [303], Tsites [304], hidrofiliia [305], índice antigénico [306] o los procedimientos desvelados en las preferencias 307-311, etc.). Los epítipos son las partes de un antígeno que son reconocidos por y se unen a los sitios de unión al antígeno de anticuerpos o receptores de linfocitos T, y también se pueden denominar "determinantes antigénicos".

Cuando se omite un "dominio" del antígeno, esto puede implicar la omisión de un péptido señal, de un dominio citoplasmático, de un dominio transmembrana, de un dominio extracelular, *etc.*

La expresión "que comprende" engloba "que incluye" así como "que consiste" por ejemplo una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo X + Y.

5 El término "aproximadamente" en relaciona un valor numérico, x, significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

Las referencias a un porcentaje de identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos significan que, cuando se alinean, es el porcentaje de aminoácidos es el mismo al comparar las dos secuencias. Este alineamiento y el porcentaje de homología o identidad de secuencias se pueden determinar usando programas de software conocidos en la técnica, por ejemplo los que se describen en la sección 7.7.18 de la ref. 312. Un alineamiento preferente se determina con el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman usando una búsqueda de huecos afines con una penalización abierta de hueco de 12 y una penalización de extensión de hueco de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman se desvela en la ref. 313.

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 muestra el curso de la mortalidad de ratones después de estimulación bacteriana, seguido durante hasta 10 días, después de inmunización con spr0565 o spr1431, en comparación con el curso de mortalidad de ratones en un grupo de control. La Figura 2 muestra datos similares para antígenos combinados.

20 La Figura 3 muestra índices bacterianos (CFU/ml) en la sangre de ratones, en comparación con grupos de ensayo con grupos de control (ctrl). Los círculos son animales individuales, y la barra es la media geométrica. Los datos son de los grupos de animales: (3A) 0; (3B) 1; (3C) 4; (3D) 6. La Figura 4 muestra datos de supervivencia (días) para los mismos grupos. Los diamantes son animales individuales y las barras muestran la media.

La Figura 5 muestra el curso de mortalidad en la Figura 2, pero con diferentes combinaciones de antígeno.

La Figura 6 muestra resultados de experimentos de bacteriemia. El eje Y muestra CFU/ml y los números por debajo del eje X muestran los valores de P calculados con el ensayo U.

25 La Figura 7 muestra resultados de experimentos de mortalidad. El eje Y muestra el tiempo de supervivencia (días) y los números por debajo del eje X muestran los valores de P calculados con el ensayo U.

La Figuras 8-25 y 28-31 y 33-36 muestran el mismo patrón que el de las figuras 6 y 7.

30 La Figura 26 muestran los resultados de un ensayo de OPKA a dos diluciones de suero (1/12 o 1/36). Cada triplete muestra datos con un control de PBS (parte izquierda), combinación 1 (parte media) o combinación 2 (parte derecha). El eje Y muestra el % de mortalidad.

La Figura 27 muestra resultados de los experimentos de OPKA con suero diluido.

La Figura 32 muestra purificación de genes para híbridos de spr2021 y spr0096. Las bandas de la parte izquierda son las proteínas híbridas y las bandas en la parte derecha son un patrón de BSA (64kDa). La Figura 32A muestra spr2021-spr0096 y la Figura 32B muestra spr0096-spr2021.

Modos para realizar la invención

Identificación del antígeno

Se seleccionaron doce polipéptidos neumocócicos para investigación inmunológica. Se enumeraron de acuerdo con el genoma de R6 [84], estos doce son: spr0057; spr0286; spr0565; spr0867; spr1098; spr1345; spr1416; spr1418; spr1431; spr1739; y spr2021.

40 El antígeno spr0057 se anota como β -N-acetilhexosaminidasa (strH), que escinde N-acetilglucosamina en glicoproteínas humanas [314]. Por lo tanto, la enzima podría facilitar la patogénesis/ colonización de seres humanos, y su bloqueo podría ser útil para fines de vacunación. Además, la proteína se sitúa en la superficie, estando anclada a LPxTG, y se han observado sueros inmunorreactivos en pacientes convalecientes de neumonía y meningitis [315]. La secuencia de spr0057 está conservada en un 98,6 % entre 22 cepas neumocócicas diferentes, y por lo tanto puede ofrecer una amplia protección. Está ausente en *S. mitis* y *S. mutans*. No hay estudios publicados sobre la eficacia protectora de spr0057 como un inmunógeno. El gen spr0057 de tipo silvestre tiene una longitud de 3939 nucleótidos, pero para fines de inmunización, se usó un fragmento de 3741-mer (que codifica la SEQ ID NO: 180). Cuando se expresa como una proteína recombinante etiquetada con His, la actividad enzimática se observa *in vitro* cuando se usa un sustrato de 4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida, pero no cuando se usa un sustrato de 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido. La expresión de spr0057 *in vivo* por neumococos se controló en lavados nasales y pulmonares, y estaba fuertemente regulada de forma positiva.

El antígeno spr0096 se anota como una proteína hipotética que contiene un motivo de LysM. La secuencia de spr0096 está conservada en un 99 % entre 22 cepas neumocócicas diferentes, y por lo tanto puede ofrecer una amplia protección. El gen de tipo silvestre spr0096 tiene una longitud de 504 nucleótidos, pero para fines de inmunización se usó un fragmento de 423-mer (que codifica la SEQ ID NO: 229).

- 5 El antígeno spr0286 se anota como hialuronidasa (Hilo), que degrada el ácido hialurónico, un componente de la matriz extracelular. La proteína se sitúa en la superficie, estando anclada a LPxTG. The spr0286 La secuencia de 98.8 % está conservada en un entre 22 cepas neumocócicas diferentes, y por lo tanto puede ofrecer una amplia protección. Aunque la hialuronidasa es un factor de virulencia, la referencia 316 informó que la hialuronidasa ni influía en el curso clínico de la enfermedad ni tenía ningún efecto en la propagación bacteriana sistémica en el modelo de enfermedad de los autores. El gen spr0286 de tipo silvestre tiene una longitud de 3201 nucleótidos, pero para fines de inmunización se usó un fragmento de 1884-mer (que codifica la SEQ ID NO: 182) o fragmento de 1356-mer (que codifica la SEQ ID NO: 183).

- 15 El antígeno spr0565 se anota como β -galactosidasa (BgaA), que escinde la galactosa en glicoproteínas humanas [314]. Por lo tanto, la enzima podría facilitar la patogénesis/ colonización de seres humanos, y su bloqueo podría ser útil para fines de vacunación. Además, la proteína se sitúa en la superficie, estando anclada a LPxTG, y se han observado sueros inmunorreactivos en pacientes convalecientes de neumonía y meningitis. May reiniciar la secuencia spr0565 está conservada en un 97,9 % entre 22 cepas neumocócicas diferentes, y por lo tanto puede ofrecer una amplia protección. No hay estudios publicados sobre la eficacia protectora de spr0565 como un inmunógeno. El gen spr0565 de tipo silvestre tiene una longitud de 6687 nucleótidos, pero para fines de
20 inmunización se usó un fragmento de 6444-mer (que codifica la SEQ ID NO: 184). Cuando se expresa como una proteína recombinante etiquetada con His, la actividad enzimática se observa *in vitro* cuando se usa un sustrato de 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosido, pero no cuando se usa un sustrato de 4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida. La expresión de spr0565 *in vivo* por neumococos se controló en lavados nasales y pulmonares, y estaba fuertemente regulada de forma positiva.

- 25 El antígeno spr0867 se anota como endo- β -N-acetilglucosaminidasa (LytB), que media la separación celular durante la replicación bacteriana. La proteína está situada en la superficie, siendo una proteína de unión a colina [317], y se han observado sueros inmunorreactivos en pacientes convalecientes. La secuencia de spr0867 está conservada en un 98,8 % entre 22 cepas neumocócicas diferentes, y por lo tanto puede ofrecer una amplia protección. Se ha informado que es un inmunógeno protector cuando se usa sola [318]. Algunas variaciones alélicas se discuten en la referencia 319. El gen de tipo silvestre spr0867 tiene una longitud de 2109 nucleótidos, pero para fines de
30 inmunización se usó un fragmento de 2040-mer (que codifica la SEQ ID NO: 185).

- El antígeno spr1098 se anota como sortasa A (srTA), que ancla proteínas del motivo LPXTG a la superficie neumocócica. La proteína está situada en la membrana. La secuencia de spr1098 está conservada en un 100 % entre 22 diferentes cepas neumocócicas, y por lo tanto puede ofrecer una amplia protección. Algunos detalles
35 adicionales sobre el polipéptido se proporcionan en las referencias 320 y 321. No hay estudios publicados sobre la eficacia protectora de spr1098 como un inmunógeno. El gen de tipo silvestre spr1098 tiene una longitud de 744 nucleótidos, pero para fines de inmunización se usó un fragmento de 654-mer (que codifica la SEQ ID NO: 187).

- El antígeno spr1345 se anota como proteína de la familia de anclaje de la superficie de la pared celular, una adhesina que se une a las mucinas. La proteína se sitúa en la superficie, estando anclada a LPxTG. La secuencia de
40 spr1345 está conservada en un 100 % entre 22 cepas neumocócicas diferentes, aunque diferentes cepas tienen diferentes números de secuencias de repetición, y por lo tanto puede ofrecer una amplia protección. Algunos detalles adicionales sobre polipéptido se proporcionan en la referencia 322. No hay estudios publicados sobre la eficacia protectora de spr1345 como un inmunógeno. El gen de tipo silvestre spr1345 tiene una longitud de 609 nucleótidos, pero para fines de inmunización se usó un fragmento de 495-mer (que codifica la SEQ ID NO: 188).

- 45 El antígeno spr1416 se anota como una proteína hipotética, y parece que es citoplasmático. Tiene una función desconocida, pero la secuencia de spr1416 está conservada en un 100 % entre 22 cepas neumocócicas diferentes, y por lo tanto puede ofrecer una amplia protección. No hay estudios publicados sobre spr1416. El gen de tipo silvestre spr1416 tiene una longitud de 387 nucleótidos, pero para fines de inmunización se usó un fragmento de 381-mer.

- 50 El antígeno spr1418 se anota como una proteína hipotética conservada. La proteína está situada en la superficie, basándose en la presencia de un péptido líder. Tiene una función desconocida, pero se han observado sueros inmunorreactivos en pacientes convalecientes de neumonía y meningitis. La secuencia de spr1418 está conservada en un 99,8 % entre 22 cepas neumocócicas diferentes, y por lo tanto puede ofrecer una amplia protección. No hay estudios publicados sobre spr1418. El gen de tipo silvestre spr0481 tiene una longitud de 780 nucleótidos, pero para
55 fines de inmunización se usó un fragmento de 705-mer.

El antígeno spr1431 se anota como lisozima (LytC), que media la autólisis. La proteína se sitúa en la superficie, estando anclada a LPxTG, pero se han observado sueros inmunorreactivos en pacientes convalecientes de neumonía y meningitis. La secuencia de spr1431 está conservada en un 98 % entre 22 cepas neumocócicas diferentes, y por lo tanto puede ofrecer una amplia protección. Algunos detalles adicionales sobre el polipéptido se

proporcionan en las referencias 323 y 324. Algunos datos de protección con LytC se informan en la referencia 318. El gen de tipo silvestre spr1431 tiene una longitud de 1506 nucleótidos, pero para fines de inmunización se usó un fragmento de 1407-mer (que codifica la SEQ ID NO: 189).

5 El antígeno spr1739 es la neumolisina, una toxina formadora de poros citoplasmáticos secretada. Se han observado sueros inmunorreactivos en pacientes convalecientes de neumonía y meningitis. La secuencia de spr1739 está conservada en un 100 % entre 22 cepas neumocócicas diferentes, y por lo tanto puede ofrecer una amplia protección. La neumolisina se ha usado anteriormente en combinación con CbpA (PspC) [325] u otros antígenos [2] para inmunización.

10 El antígeno spr2021 se anota como una proteína de 45 kDa secretada (PcsB). Es una hidrolasa esencial implicada en la separación de células en división, e inicialmente se identificó porque se observaban sueros inmunorreactivos en pacientes convalecientes de neumonía y meningitis. La secuencia de spr2021 está conservada en un 100 % entre 22 cepas neumocócicas diferentes, y por lo tanto puede ofrecer una amplia protección. Se ha confirmado como un candidato a vacuna líder en la referencia 78. Algunos detalles adicionales sobre el polipéptido PcsB se proporcionan en las referencias 326 y 327. El gen spr2021 de tipo silvestre tiene una longitud de 1179 nucleótidos, pero para fines de inmunización se usó un fragmento de 1098-mer (que codifica la SEQ ID NO: 190).

15 Un criterio para seleccionar estos genes es su alto nivel de conservación a través de un panel de 22 cepas neumocócica se incluyen cepas representativas de diferentes serogrupos patógenos. Hay varios genes neumocócicos que están presentes en todas las secuencias genómicas publicadas en la actualidad, con un nivel elevado de identidad de secuencias, pero que están ausentes en al menos una cepa en el panel. Por lo tanto, los genomas actuales pueden dar una impresión equivocada de que un gen en particular está conservado. Por ejemplo, una proteína de la familia (DAACS) de cotransportador de dicarboxilato/aminoácido:cation (Na^+ o H^+) está presente en los genomas de las cepas SP3-BS71, SP6-BS73, SP9-BS68, SP11-BS70, SP14-BS69, SP18-BS74, SP19-BS75, SP23-BS72, CGSP14, D39, R6 y TIGR4, pero no se observan las cepas JJA y P1031.

20 Tanto spr0057 como spr0565 son exoglicosidasas de superficie expuesta que desglucosilan proteínas hospedadoras. Ambos antígenos son enzimáticamente activos *in vitro* cuando se expresan en forma etiquetada con His, como se muestra usando un sustrato tal como 4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glucosaminida.

25 Todos los antígenos spr0096, spr0867, spr1431 y spr2021 pueden ser peptidoglucano hidrolasas.

Ensayo de eficacia

30 Se usaron diversos sistemas de modelo de enfermedad neumocócica para someter a ensayo la eficacia de los inmunógenos. En un modelo de ratón de infección intraperitoneal, los antígenos se administraron por vía intraperitoneal y la estimulación fue intraperitoneal. Se inmunizaron ratones BALB/c hembra libres de patógenos específicos, de seis semanas de edad por vía intraperitoneal los días 0, 14, y 28. Las inmunizaciones se realizaron usando proteínas recombinantes individuales (20 μg /ratón) o con una combinación de las mismas (10 μg cada una/ratón), junto con hidróxido de aluminio o adyuvante de Freund. Los controles recibieron cursos idénticos de solución salina más adyuvante. A continuación, los ratones se estimularon por vía intraperitoneal con una dosis letal de una cepa homóloga o heteróloga (D39, TIGR4, SP-PD, PT131, Strep-5, 35Bsme15). Las dosificaciones bacterianas usadas fueron por lo general: 5 x 10⁵ CFU/ratón de D39, aproximadamente 10² CFU/ratón de TIGR4, o aproximadamente 5,4 x 10⁴ CFU/ratón de SP-PD. En algunos casos, se realizaron experimentos similares en ratones CD1, ajustando la dosis de estimulación para conseguir infección y mortalidad. La eficacia de la inmunización se somete a ensayo mediante la evaluación del efecto de la vacunación en bacteriemia (a las 5 y/o 24 horas después de la infección) y la mortalidad (controlada durante 10 días después de estimulación bacteriana o un periodo superior, dependiendo de la cepa de infección).

45 En un modelo de transferencia pasiva, se administraron sueros frente a las proteínas recombinantes por vía intraperitoneal y la estimulación fue intraperitoneal. Se desarrollaron antisueros en ratones inmunizados por vía intraperitoneal como se ha descrito anteriormente. Los ratones BALB/c de 10 semanas de edad recibieron 50 μl de suero inmune por vía intraperitoneal 15 min antes de la estimulación. Los controles recibieron cursos idénticos de solución salina más adyuvante. Los ratones se estimularon a continuación por vía intraperitoneal.

50 En un modelo de infección intravenosa, los antígenos se administraron por vía intraperitoneal y la estimulación fue intravenosa. Los ratones CD-1 de cinco semanas de edad se inmunizaron por vía intraperitoneal los días 0, 14, y 28. Las inmunizaciones se realizaron usando proteínas recombinantes de forma individual (20 μg /ratón) o con una combinación de las mismas (10 μg de cada una/ratón), junto con adyuvante de Freund. Los controles recibieron cursos idénticos de solución salina más adyuvante. A continuación, los ratones se estimularon por vía intravenosa con una dosis letal de una cepa homóloga o heteróloga (D39 o TIGR-4). Las dosificaciones bacterianas usadas fueron: aproximadamente 10⁵ CFU/ratón de D39, 2 x 10⁵ CFU/ratón de TIGR-4, aproximadamente 10⁷ CFU/ratón de PT131, aproximadamente 10⁴ CFU/ratón de Strep-5, aproximadamente 2 x 10⁷ CFU/ratón de 35Bsme15. La eficacia de los candidatos a vacuna se somete a ensayo mediante la evaluación del efecto de la vacunación en bacteriemia (a las 48 horas después de la infección) y la mortalidad (controlada durante 10 días después de estimulación bacteriana o un periodo superior, dependiendo de la cepa de infección).

En un modelo de infección intranasal, los antígenos se administraron por vía intranasal, y la estimulación fue intranasal. Los ratones C57BL/6 de seis semanas de edad se inmunizaron por vía intranasal los días 0, 16 y 32. Las inmunizaciones se realizaron usando proteínas recombinantes (20 µg/ratón) junto con adyuvante LTK63. Los controles recibieron cursos idénticos de LTK63 o PBS. Los ratones se estimularon con 10⁹ CFU de TIGR4. La eficacia de los candidatos a vacuna se somete a ensayo mediante la evaluación del efecto de la vacunación en mortalidad (controlada durante 2-3 semanas después de la estimulación bacteriana) y en una colonización nasofaríngea en infección pulmonar. Otros experimentos se realizaron con diferentes cepas de ratón y bacterianas y administrando los antígenos bien por vía mucosal o por vía sistémica.

Estudios de inmunogenicidad y protección con antígenos individuales

Los siguientes antígenos se sometieron a ensayo de forma individual en un modelo de ratón: spr0057; spr0286; spr0565; spr0867; spr1098; spr1345; spr1416; spr1418; spr1431; y spr2021. El antígeno spr2086 se dividió en dos dominios y se sometió a ensayo como spr2086A y spr2086B. Los antígenos se trataron con adyuvante con adyuvante de Freund y se sometieron al ensayo en ratones CD1 y/o BALB/c. La estimulación se realizó con cualquiera de la cepa D39 o TIGR4 de neumococos, mediante cualquiera de una vía intravenosa (i.v.) o intraperitoneal (i.p.). Cada grupo incluía al menos 8 ratones. Un grupo de control recibió adyuvante en solución salina tamponada con fosfato. La cepa TIGR4 es muy virulenta, y por lo tanto una protección frente a la estimulación con esta cepa indica un nivel de eficacia elevado.

En términos de bacteriemia, los resultados se determinaron midiendo CFU/ml en la sangre de animales inmunizados y de control, 24 horas después de la estimulación. Además, los números de animales infectados en ambos grupos se compararon usando el ensayo U de Mann-Whitney de una cola. Los resultados fueron los que siguen a continuación:

| Ag | Ratones | Cepa | Vía de Estimulación | CFU/ml (media geométrica) | | | Número de infectados | | |
|-------|---------|-------|---------------------|---------------------------|-----------|------------|----------------------|---------|-------|
| | | | | Ensayo | Control | Proporción | Ensayo | Control | P |
| 0057 | CD1 | D39 | i.v. | 6,15 E+03 | 9,22 E+04 | 15,0 | 11/9 | 5/15 | 0,064 |
| 0057 | BALB/c | D39 | i.p. | 1,77 E+05 | 5,76 E+06 | 32,5 | 2/8 | 0/9 | 0,056 |
| 0286A | CD1 | D39 | i.v. | 1,25 E+02 | 1,70 E+04 | 135,2 | 19/1 | 10/10 | 0,005 |
| 0286B | BALB/c | D39 | i.p. | 6,26 E+02 | 5,38 E+04 | 85,9 | 3/5 | 1/6 | 0,027 |
| 0565 | CD1 | D39 | i.v. | 2,44 E+02 | 8,0 E+04 | 327,6 | 15/5 | 5/15 | 0,000 |
| 0867 | CD1 | D39 | i.v. | 2,97 E+03 | 9,16 E+04 | 30,9 | 6/4 | 3/7 | 0,095 |
| 1098 | CD1 | D39 | i.v. | 2,49 E+03 | 3,47 E+05 | 139,6 | 6/4 | 3/7 | 0,062 |
| 1098 | BALB/c | D39 | i.p. | 9,91 E+03 | 4,18 E+06 | 421,3 | 3/4 | 0/8 | 0,007 |
| 1098 | BALB/c | TIGR4 | i.p. | 1,06 E+03 | 1,91 E+05 | 180,9 | 4/4 | 0/8 | 0,007 |
| 1345 | CD1 | D39 | i.v. | 4,24 E+02 | 1,77 E+05 | 417,7 | 7/3 | 4/6 | 0,038 |
| 1345 | BALB/c | D39 | i.p. | 5,87 E+03 | 7,99 E+05 | 136,1 | 1/7 | 0/16 | 0,011 |
| 1416 | BALB/c | TIGR4 | i.p. | 5,56 E+04 | 1,66 E+06 | 29,8 | 0/8 | 1/15 | 0,077 |
| 1418 | BALB/c | D39 | i.p. | 6,53 E+03 | 7,99 E+05 | 122,4 | 2/6 | 0/16 | 0,004 |
| 1431 | CD1 | D39 | i.v. | 4,68 E+02 | 2,74 E+05 | 585,5 | 13/7 | 6/14 | 0,002 |
| 2021 | CD1 | D39 | i.v. | 1,63 E+04 | 6,05 E+04 | 3,7 | 10/10 | 6/14 | > 0,1 |
| 2021 | BALB/c | TIGR4 | i.p. | 1,69 E+05 | 1,19 E+06 | 7,1 | 0/8 | 1/15 | 0,040 |

En términos de supervivencia, los resultados se determinaron midiendo la supervivencia media (en días) por grupo. Además, los números de animales que sobreviven en ambos grupos se compararon usando un ensayo U de Mann-Whitney de una cola. Los resultados se encuentran en la tabla que sigue a continuación. Además, el número de ratones que sobrevive se siguió en el tiempo, y un ejemplo de tales datos se muestra en la Figura 1.

| Ag | Ratones | Cepa | Vía | Supervivencia (días) | | Vivos/muertos | | |
|-------|---------|-------|------|----------------------|---------|---------------|---------|-------|
| | | | | Ensayo | Control | Ensayo | Control | P |
| 0057 | CD1 | D39 | i.v. | > 10,5 | 5,5 | 11/9 | 5/15 | 0,064 |
| 0057 | BALB/c | D39 | i.p. | 4 | 2,5 | 3/7 | 0/9 | 0,067 |
| 0286A | CD1 | D39 | i.v. | > 10,5 | 7,5 | 17/3 | 9/11 | 0,006 |
| 0286B | BALB/c | D39 | i.p. | 8 | 5,5 | 4/4 | 2/5 | > 0,1 |
| 0565 | CD1 | D39 | i.v. | > 10,5 | 5 | 14/6 | 6/14 | 0,002 |
| 0867 | CD1 | D39 | i.v. | > 11,5 | 6,5 | 6/4 | 3/7 | > 0,1 |
| 1098 | CD1 | D39 | i.v. | > 10,5 | 6 | 6/4 | 3/7 | > 0,1 |
| 1098 | BALB/c | D39 | i.p. | 5,5 | 4,5 | 3/4 | 1/7 | > 0,1 |
| 1098 | BALB/c | TIGR4 | i.p. | 6,5 | 2,5 | 3/5 | 1/7 | 0,032 |
| 1345 | CD1 | D39 | i.v. | > 10,5 | 4,5 | 8/2 | 3/7 | 0,018 |
| 1345 | BALB/c | D39 | i.p. | 4,5 | 4 | 3/5 | 3/13 | > 0,1 |
| 1416 | BALB/c | TIGR4 | i.p. | 3 | 1,5 | 2/6 | 1/15 | 0,086 |
| 1418 | BALB/c | D39 | i.p. | 5,5 | 4 | 3/5 | 3/13 | > 0,1 |
| 1431 | CD1 | D39 | i.v. | > 10,5 | 4,5 | 15/5 | 6/14 | 0,002 |
| 2021 | CD1 | D39 | i.v. | > 10,5 | 4,5 | 11/9 | 4/17 | 0,061 |
| 2021 | BALB/c | TIGR4 | i.p. | 2 | 1,5 | 2/6 | 0/16 | > 0,1 |

Por lo tanto, para todos los antígenos sometidos a ensayo, se produjo una reducción sustancial de la bacteriemia y/o un aumento de la supervivencia.

5 En resumen, cuatro antígenos preferentes son eficaces frente a las cepas de serotipo 2, 3, 4 y 35B como sigue a continuación:

| | OPKA | Tipo 2 | Tipo 3 | Tipo 4 | Tipo 35 |
|---------|------|--------|--------|--------|---------|
| spr0057 | +/- | ++ | - | + | - |
| spr0096 | + | + | ++ | + | ++ |
| spr0565 | + | ++ | ++ | ++ | - |
| spr2021 | ++ | +/- | - | +/- | ? |

Aunque el serotipo 4 está cubierto con las vacunas de conjugado actuales, los serotipos 2, 3 y 35B no lo están.

Estudios de inmunogenicidad y protección con antígenos combinados

10 Las siguientes combinaciones de antígenos se sometieron a ensayo en el mismo modelo de razón que los antígenos individuales: (1) spr0057 + spr0096 + spr2021; (2) spr0057 + spr0096 + spr2021; (3) spr0057 + spr0096 + spr2021; (4) spr0057 + spr2021; (5) spr0057 + spr0565 + spr2021. Además, un grupo de control (0) se inmunizó un con una combinación de PspC y una neumolisina detoxificada ('Ply-detox') [325], y un grupo (6) recibió una combinación de spr0565 + spr2021 + Ply-detox. Los resultados fueron los que siguen a continuación:

| | CFU/ml (media geométrica) | | | Número de infectados | | | Supervivencia | | Vivos/muertos | | |
|---|---------------------------|-----------|------------|----------------------|------|-------|---------------|------|---------------|------|--------|
| | Ensayo | Control | Proporción | Ensayo | Ctrl | P | Ensayo | Ctrl | Ensayo | Ctrl | P |
| 0 | 1,70 E+05 | 9,60 E+06 | 56,5 | 4/26 | 0/30 | 0,009 | 4,5 | 1 | 12/18 | 2/28 | <0,001 |
| 1 | 4,21 E+03 | 1,19 E+06 | 283,4 | 0/8 | 1/15 | 0,001 | > 10,5 | 4 | 6/2 | 0/16 | <0,001 |
| 2 | 3,87 E+04 | 1,40 E+06 | 36,2 | 2/6 | 1/7 | 0,065 | 5 | 1,5 | 3/5 | 2/6 | > 0,1 |
| 3 | 1,18 E+03 | 4,21 E+04 | 35,5 | 7/3 | 3/7 | 0,062 | > 10,5 | 7 | 7/3 | 3/7 | > 0,1 |
| 4 | 1,07 E+04 | 3,44 E+05 | 32,0 | 1/7 | 1/15 | 0,014 | 5,5 | 1,5 | 2/6 | 3/13 | 0,019 |
| 5 | 3,48 E+02 | 4,21 E+04 | 120,8 | 7/3 | 3/7 | 0,026 | > 10,5 | 7 | 8/2 | 3/7 | 0,018 |
| 6 | 1,62 E+03 | 3,16 E+05 | 194,6 | 7/3 | 1/9 | 0,014 | > 10,5 | 3,5 | 7/3 | 1/9 | 0,014 |

5 Los datos de bacteriemia para los grupos 0, 1, 4 y 6 se muestran en la Figura 3. Los datos de supervivencia para los mismos grupos se muestran en la Figura 4. Los datos de supervivencia para los grupos 1 y 5 se muestran en la Figura 2.

En experimentos adicionales, los ratones recibieron (7) spr0565 + spr2021 o (8) spr2021 + Ply-detox. Los datos de supervivencia para los grupos 6, 7 y 8 se encuentran en la Figura 5.

10 En experimentos adicionales, los ratones recibieron una combinación de spr0565, PmP y spr2021. Los sueros se sometieron a ensayo en el ensayo opsonofagocítico de muerte (OPKA). Los resultados se encuentran en la Figura 27. Se necesitó una dilución de 10.000 –veces antes de que la actividad suero inmune disminuyera a niveles de control.

Combinación 1 a Combinación 4

Se prepararon cuatro combinaciones de antígenos diferentes:

- 15 Combinación 1: spr0057 + spr0096 + spr2021.
 Combinación 2: spr0057 + spr0565 + spr2021.
 Combinación 3: spr0057 + spr0096 + spr0565.
 Combinación 4: spr0057 + spr0096 + spr0565 + spr2021.

Los conejos se inmunizaron y sus sueros inmunes se transfirieron en ratones BALB/c para someter a ensayo la protección pasiva frente a la cepa TIGR4.

20 Los ratones también se inmunizaron y a continuación se sometieron a ensayo en modelos de estimulación usando cepas que incluían TIGR4 (estimulación i.p.) y D39, PT131 y TREP6A (estimulación i.v.). La cepa TIGR4 es el serotipo 4, que está cubierto con Prevnar™ (cepas 'VT'), pero las otras 3 cepas son los serotipos 2, 3 y 6A, que no están cubiertos con Prevnar™ (cepas 'NVT'). Los serotipos 3, 4 y 6A están cubiertos con las vacunas de de sacárido 13-valente propuestas [328], pero las cepas del serotipo 2 no están.

25 Las Figuras 6 y 7 muestran los resultados obtenidos en el ensayo de transferencia pasiva. La combinación 1 y la combinación 2 proporcionaron al menos una reducción log de la bacteriemia (Fig. 6) y dio como resultado un tiempo de supervivencia de al menos 10 días (Fig. 7). La eficacia no mejoró con el aumento de la dosificación a 50 µg de cada antígeno.

30 Las Figuras 8 y 9 muestran resultados obtenidos en el modelo de estimulación usando la cepa PT131. La combinación 1 y la combinación 2 fueron de nuevo eficaces, con la combinación 2 siendo superior. Las Figuras 10 y 11 muestran resultados obtenidos en el modelo de estimulación usando $1,1 \times 10^4$ CFU de la cepa STREP-5 después de inmunización con la combinación 1.

La Figura 12 muestra la reducción en CFU/ml 24 horas después de la estimulación con OREP-3. Tanto la combinación 1 como la combinación 2 son eficaces.

35 Las Figuras 13 y 14 muestran resultados obtenidos después de estimulación de ratones inmunizados con la combinación 2 con TREP-6A.

Como se muestra en la Figura 17, la combinación 1 disminuye la bacteriemia después de una estimulación intra nasal con una dosis elevada ($1,1 \times 10^7$ cfu) con TIGR4, aunque la colonización nasal y la infección pulmonar no se

vieron afectadas. Usando una estimulación intranasal subletal en el último estadio de la infección, las figuras 18-22 muestra que la combinación 1 es eficaz.

La eficacia frente a la estimulación intranasal con la cepa 14-Spain-15 se muestran en las Figuras 23 (lavado nasal, 48 horas) y 24 (lavado pulmonar, 48 horas).

- 5 La Figura 25 presume la mortalidad después de la estimulación con TIGR-4 (estimulación i.p.; Fig. 25A) o con D39, PT131 o TREP6A (estimulación i.v.; Fig. 25B) después de inmunización con la combinación 2.

Por lo tanto, la inmunización con la combinación 1 o con la combinación 2 es eficaz frente a la infección con una gran diversidad de cepas neumocócicas.

- 10 La Figura 26 muestra resultados de OPKA obtenidos usando el suero de animales de control o de animales inmunizados con la combinación 1 o con la combinación 2. Se observan grandes aumentos de la actividad de OPKA usando la combinación 2 a una dilución tanto de 1/12 como de 1/36.

La combinación 1 se modificó mediante la adición de spr1416, spr1418 o spr1431. Como se muestra en las Figuras 15 y 16, la combinación 1 mantiene su eficacia frente a la estimulación con TIGR4 incluso cuando se añaden estos tres antígenos.

- 15 La combinación 1, que incluye tres antígenos, también se comparó con una combinación de dos de esos tres antígenos (spr0057 + spr2021) usando inmunización intranasal y estimulación intranasal. Aunque las dos combinaciones presentaban una pequeña diferencia en términos de mortalidad o bacteriemia (tanto después de 24 horas como de 10 días) usando TIGR4 como una cepa de estimulación, los lavados nasales y pulmonares después de 10 días presentaban reducciones significativas (Figuras 33 y 34). También se observan buenos resultados cuando se usa en 14-Spain15 como la cepa de estimulación (Figuras 35 y 36).

- 20 La combinación 1 también se comparó con spr0565 solo. Aunque spr0565 reducía la bacteriemia después de 24 horas, el efecto no se observaba después de 48 horas. Por el contrario, la eficacia de la combinación 1 llegó a ser evidente solamente después de 48 horas. No se observó eficacia frente a la colonización nasal por la infección pulmonar. En resumen, los resultados más representativos con la combinación 1 fueron los que siguen a continuación:

| Estimulación | | | Bacteriemia | | | Supervivencia | | |
|---------------|-----|----------|-----------------|----------|----------|---------------|---------|----------|
| | | | Media geom. CFU | | ensayo U | media de días | | ensayo U |
| Serotipo-cepa | vía | dosis | Combinación | Control | P | Combinación | Control | P |
| 02-D39 | ip | 1,1 E+03 | 1,9 E+04 | 1,1 E+05 | 0,253 | 6,25 | 1,5 | 0,097 |
| 02-D39 | iv | 2,1 E+05 | 3,4 E+04 | 4,5 E+06 | 0,038 | 9 | 2,5 | 0,022 |
| 03-0REP3 | ip | 4,5 E+03 | 1,7 E+03 | 2,5 E+04 | < 0,001 | 2,5 | 2,5 | 0,117 |
| 04-TIGR4 | in | 4,5 E+06 | 1,2 E+02 | 8,5 E+02 | 0,164 | - | - | - |
| 04-TIGR4 | in | 1,1 E+07 | 7,9 E+03 | 2,1 E+05 | 0,047 | - | - | - |
| 04-TIGR4 | ip | 1,1 E+02 | 4,2 E+03 | 1,2 E+06 | 0,001 | 10,5 | 1,5 | < 0,001 |
| 04-TIGR4 | ip | 1,5 E+02 | 1,6 E+04 | 3,4 E+05 | 0,053 | 5,5 | 1,5 | 0,096 |
| 04-TIGR5 | ip | 7,0 E+01 | 1,5 E+02 | 2,6 E+05 | < 0,001 | 10,5 | 1,5 | 0,025 |
| 04-TIGR4 | iv | 3,2 E+06 | 1,1 E+04 | 4,1 E+06 | 0,007 | 11,5 | 5 | 0,018 |
| 05-STREP5 | iv | 1,1 E+04 | 4,4 E+03 | 7,7 E+04 | 0,045 | 6,5 | 4,5 | 0,036 |
| 06B-Finland12 | ip | 5,0 E+04 | 6,6 E+03 | 5,2 E+06 | 0,001 | 5,5 | 1,5 | 0,164 |
| 19F-5167 | iv | 7,0 E+07 | 7,8 E+03 | 1,5 E+05 | 0,032 | 7,5 | 3,5 | 0,062 |
| 35B-SME15 | iv | 4,5 E+07 | 1,3 E+04 | 1,8 E+05 | 0,083 | 9 | 5,5 | 0,095 |

En resumen, los resultados más representativos con la combinación 2 fueron los que siguen a continuación:

| Estimulación | | | Bacteriemia | | | Supervivencia | | |
|---------------|-----|----------|-----------------|----------|----------|---------------|---------|----------|
| | | | Media geom. CFU | | ensayo U | media de días | | ensayo U |
| Serotipo-cepa | vía | dosis | Combinación | Control | P | Combinación | Control | P |
| 02-D39 | iv | 1,6 E+05 | 3,5 E+02 | 4,2 E+04 | 0,026 | 10,5 | 7 | 0,018 |
| 03-0REP3 | ip | 4,5 E+03 | 2,0 E+03 | 2,5 E+04 | 0,019 | 3,5 | 2,5 | 0,005 |
| 03-PT131 | iv | 9,0 E+06 | 2,5 E+02 | 8,3 E+03 | 0,003 | 10,5 | 7 | 0,012 |
| 04-TIGR4 | ip | 1,5 E+02 | 6,3 E+02 | 6,5 E+04 | 0,007 | 10,5 | 2,5 | 0,005 |
| 04-TIGR5 | ip | 7,0 E+01 | 1,1 E+03 | 3,9 E+04 | 0,032 | 10,5 | 9 | 0,139 |
| 04-TIGR4 | iv | 2,8 E+06 | 2,3 E+03 | 1,8 E+04 | 0,176 | 9,5 | 5,5 | 0,158 |
| 05-STREP5 | iv | 9,0 E+03 | 1,7 E+04 | 1,1 E+05 | 0,083 | 6,5 | 5,5 | 0,072 |
| 06A-TREP-6A | iv | 3,5 E+07 | 1,8 E+05 | 7,7 E+07 | 0,007 | 10,5 | 2,5 | 0,004 |
| 06B-Finland12 | ip | 5,0 E+04 | 5,7 E+05 | 5,2 E+06 | 0,014 | 1,5 | 1,5 | 0,191 |
| 35B-SME15 | iv | 6,8 E+07 | 2,7 E+04 | 1,1 E+06 | 0,045 | 6,5 | 5 | 0,095 |

En resumen, los resultados más representativos con la combinación 4 fueron los que siguen a continuación:

| Estimulación | | | Bacteriemia | | | Supervivencia | | |
|---------------|-----|----------|-----------------|----------|----------|---------------|---------|----------|
| | | | Media geom. CFU | | ensayo U | media de días | | ensayo U |
| Serotipo-cepa | vía | dosis | Combinación | Control | P | Combinación | Control | P |
| 02-D39 | iv | 2,3 E+05 | 1,9 E+04 | 3,3 E+06 | 0,032 | 8,5 | 3,5 | 0,053 |
| 03-0REP3 | ip | 4,5 E+03 | 9,3 E+02 | 2,5 E+04 | 0,032 | 3,5 | 2,5 | 0,005 |
| 03-PT131 | iv | 9,0 E+06 | 5,8 E+02 | 5,1 E+03 | 0,045 | 10,5 | 6,5 | 0,176 |
| 04-TIGR4 | ip | 1,4 E+02 | 2,6 E+02 | 7,9 E+03 | 0,041 | 10,5 | 7 | 0,052 |
| 04-TIGR4 | iv | 3,5 E+06 | 4,8 E+03 | 1,7 E+05 | 0,072 | 10 | 6,5 | 0,095 |
| 05-STREP5 | iv | 8,5 E+03 | 2,2 E+03 | 3,7 E+04 | 0,083 | 9 | 6,5 | 0,109 |

5 Por lo tanto las combinaciones proporcionan una buena protección frente a la bacteriemia y un aumento de la supervivencia.

Immunización intranasal de ratones con antígenos de pilus

10 Un modelo de ratón se usó para caracterizar el potencial protector de las proteínas RrgA, RrgB y RrgC de pilus neumocócicos. La inmunización intranasal de proteínas de pilus recombinantes combinadas con el mutante LTK63 de enterotoxina termolábil de *E. coli* no tóxico como adyuvante provocó respuestas de IgA e IgG en suero. Además, la inmunización con el componente principal del pilus (RrgB) condujo a la disminución de la carga bacteriana de la cepa TIGR4 invasiva en nasofaringe, pulmones y sangre y proporcionó un aumento de la supervivencia de 5 veces. No se produjo efecto en portadores nasofaríngeos asintomáticos de una cepa no invasiva, lo que apunta a la restricción del efecto protector observado a una infección fulminante.

15 Los ratones C57BL/6 hembra de seis semanas de edad se inmunizaron por vía intranasal 3 veces (intervalo de 2 semanas) con 10 µl de PBS conteniendo cualquiera de 20 µg de RrgA, RrgB o RrgC recombinante o una mezcla de 10 µg de cada uno. Las proteínas tenían una etiqueta de afinidad y usaban la secuencia de la cepa TIGR4. Todas las soluciones de proteína se administraron junto con 2 µg de LTK63. Los controles recibieron 2 µg de LTK63 en PBS, o solamente PBS. Una semana después de la inmunización final, se tomaron muestras de suero para

determinar los títulos de anticuerpos por ELISA. Los ratones se estimularon por vía intravenosa con $0,5-1 \times 10^7$ cfu/ratón de neumococos TIGR4 invasivos o la cepa 19F de serotipo colonizante. Los ratones se sacrificaron después de superar una puntuación clínica definida tal como lo aprueba el comité local para experimentos con animales. De siete a nueve días después de la infección, los ratones que sobreviven se sacrificaron. Se recuperaron las muestras de sangre, los pulmones y una muestra nasofaríngea-traqueal de lavado abundante. Las bacterias viables se cuantificaron mediante sembrado en serie de muestras de sangre. Los pulmones se pesaron, se homogeneizaron en PBS que contenía cóctel inhibidor de proteasa y se usaron para la cuantificación de bacterias viables. Para determinar el número de bacterias en el tracto respiratorio superior, la nasofaringe-traquea se lavaron *post mortem* con 30 μ l de PBS insertando un catéter de calibre 20 en la traquea proximal y recogiendo el lavado de los orificios nasales y se realizó una siembra en serie. Para determinar la colonización se usó una cámara de una manera no invasiva mediante la determinación de la intensidad de la luminiscencia en la nasofaringe, pulmones, oídos y torrente sanguíneo de ratones anestesiados. Se consideró que un umbral de 300 p/seg/cm²/sr en la zona nasal era suficiente para indicar una colonización satisfactoria.

La inmunización intranasal con proteínas de pilus provocó una respuesta sistémica de IgA e IgG. Los títulos de suero de IgA mostraban que los ratones inmunizados con proteínas de pilus individuales aumentaban una respuesta de IgA a los antígenos respectivos. No se observó respuesta a las otras dos proteínas, lo que muestra que las proteínas de pilus individual no provocan anticuerpos de reacción cruzada. Los ratones inmunizados con las 3 proteínas tenían niveles de IgA en suero comparables con las inmunizaciones individuales, aunque los niveles de anticuerpos con respecto a RrgA eran más bajos. Se obtuvieron resultados similares para niveles en suero de IgG. En resumen, una respuesta inmune, que comprende tanto IgA como IgG aumenta después de la inmunización intranasal con cualquiera de las tres proteínas de pilus, pero no con los controles.

Después de la inmunización, los ratones se infectaron por vía intranasal con una dosis elevada de la cepa TIGR4 invasiva. El análisis de las tasas de supervivencia mostraba diferencias significativas entre los diferentes grupos. Solamente un 10 % de los ratones inmunizados con PBS y un 20 % de los ratones inmunizados con LTK63 sobrevivieron a la estimulación. Los ratones presentaban recuentos bacterianos de $1 \times 10^5-10^9$ bacterias por ml de sangre y la mayoría de estos ratones sucumbieron a la enfermedad neumocócica en 96 horas después de la infección. La inmunización con RrgB más LTK63 aumentó la supervivencia de un 10 % (en el grupo de control de ratones inmunizados con PBS) a un 55 % ($p = 0,0001$). También aumentó de forma significativa ($p = 0,016$) la supervivencia en comparación con el grupo que recibía solamente el adyuvante. Una mezcla de vacuna de RrgA, RrgB y RrgC presentaba la misma protección que la vacunación con RrgB solo ($p = 0,002$, aumentaba la supervivencia de un 10 % a un 45 % en comparación con ratones inmunizados con PBS). Además, los recuentos bacterianos en el torrente sanguíneo, pulmones y nasofaringe se veían reducidos de forma significativa en ratones inmunizados con RrgB en comparación con los grupos de control. Comparado con ratones inmunizados con PBS, los recuentos bacterianos medios se redujeron de $1,5 \times 10^6$ cfu/ml a $1,0 \times 10^0$ cfu/ml ($p = 0,067$) en el torrente sanguíneo, de 5×10^4 cfu/mg de tejido a $1,5 \times 10^1$ cfu/mg de tejido ($p = 0,001$) en los pulmones y de 7×10^3 a $4,5 \times 10^2$ ($p = 0,0002$) en la nasofaringe. Por lo tanto, los ratones inmunizados con proteínas RrgB basadas en TIGR4 junto con el adyuvante mucosal LTK63 presentaban un aumento significativo de la supervivencia después de la estimulación intranasal con TIGR4 en comparación con los ratones de control no vacunados.

La inmunización no condujo a un aumento de la eliminación de los neumococos colonizantes de la nasofaringe. A diferencia de TIGR4, anteriormente se mostró que una cepa 19F del serotipo de tipo 162 de secuencia no era invasiva incluso después de una estimulación intranasal con una dosis elevada. Esta cepa hipercolonizante expresa pili que pertenecen al mismo clado que TIGR4. Solamente 1 aminoácido (A645V) se diferencia en la proteína RrgB entre las dos cepas. Los ratones inmunizados con RrgB se estimularon con esta cepa 19F, también modificada por ingeniería para expresar luciferasa. Los grupos de control recibieron LTK63 o PBS, solamente. Las IgG e IgA en suero frente a RrgB se determinaron por ELISA y los valores eran similares a los observados en los experimentos previos. Los ratones se llegaron a colonizar con aparición intermitente principalmente de otitis media y neumonía subclínicas. La colonización se determinó 24-216 horas después de la infección. Para el grupo de control tratado con PBS, el porcentaje de ratones colonizados variaba entre un 25 % (48 h p.i) un 70 % (96 h p.i.). La tasa de colonización baja inicial aumentó con el tiempo con un suceso de eliminación final teniendo efecto después de 96 horas. Las mismas observaciones se hicieron para los ratones inmunizados con LTK63 y RrgB, pero con un desplazamiento hacia una eliminación más temprana de ~24 horas. No se pudo observar diferencia significativa en los sucesos de colonización y/o eliminación entre ratones de control e inmunizados con RrgB. La aparición de otitis media y neumonía era generalmente baja, con un máximo de un 10 % de aparición en cada grupo. No se pudo establecer diferencia significativa entre los grupos. Por último, los recuentos bacterianos en la nasofaringe se determinaron después del sacrificio de los animales 9 días después de la infección. Los ratones de los tres grupos presentaban cantidades similares de bacterias en la nasofaringe ($2,8 - 4,4 \times 10^3$ por lavado). Un máximo de colonización se observó aproximadamente 96 horas después de la infección.

Polipéptidos híbridos

Se han fabricado híbridos con pares de spr0057, spr0096, spr0565 (opcionalmente en la forma spr0565A o La forma spr0565B), spr2021 y RrgA. Se han construido, expresado y purificado diversos emparejamientos. Por ejemplo, la Figura 32 incluye dos geles que muestran los pares spr2021-spr0096 y spr0096-spr2021 purificados (> 1 mg/ml, ≥ 80 % puro), ambos con un peso molecular de ~61 kDa. Aunque ambos híbridos se pudieron expresar y purificar en

ES 2 580 957 T3

forma soluble, el híbrido spr2021-spr0096 era mucho más soluble que el híbrido spr0096-spr2021.

Se han preparado las siguientes secuencias de híbridos (que tienen la fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}\{-\text{X-L-}\}_2\text{-B-COOH}$):

| A | X₁ | L₁ | X₂ | L₂ | B | SEQ ID |
|----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|---------------|
| M | spr2021 | SEQ ID 233 | spr0057 | LE | His ₆ | 193 |
| M | spr2021 | SEQ ID 233 | spr0096 | LE | His ₆ | 194 |
| M | spr2021 | SEQ ID 233 | spr0565 | SEQ ID 235 | His ₆ | 195 |
| M | spr2021 | SEQ ID 233 | spr0565A | SEQ ID 235 | His ₆ | 196 |
| M | spr2021 | SEQ ID 233 | spr0565B | SEQ ID 235 | His ₆ | 197 |
| MAS | spr2021 | SEQ ID 233 | RrgA | LE | His ₆ | 198 |
| M | spr0057 | SEQ ID 233 | spr2021 | SEQ ID 235 | His ₆ | 199 |
| M | spr0057 | SEQ ID 233 | spr0096 | LE | His ₆ | 200 |
| M | spr0057 | SEQ ID 233 | RrgA | LE | His ₆ | 201 |
| M | spr0057 | SEQ ID 233 | spr0565 | SEQ ID 235 | His ₆ | 202 |
| M | spr0057 | SEQ ID 233 | spr0565A | SEQ ID 235 | His ₆ | 203 |
| M | spr0057 | SEQ ID 233 | spr0565B | SEQ ID 235 | His ₆ | 204 |
| M | spr0096 | SEQ ID 233 | spr2021 | SEQ ID 235 | His ₆ | 205 |
| M | spr0096 | SEQ ID 233 | spr0057 | LE | His ₆ | 206 |
| M | spr0096 | SEQ ID 233 | RrgA | LE | His ₆ | 207 |
| M | spr0096 | SEQ ID 233 | spr0565 | SEQ ID 235 | His ₆ | 208 |
| M | spr0096 | SEQ ID 233 | spr0565A | SEQ ID 235 | His ₆ | 209 |
| M | spr0096 | SEQ ID 233 | spr0565B | SEQ ID 235 | His ₆ | 210 |
| MAS | RrgA | SEQ ID 233 | spr2021 | SEQ ID 235 | His ₆ | 211 |
| MAS | RrgA | SEQ ID 233 | spr0565 | SEQ ID 235 | His ₆ | 212 |
| MAS | RrgA | SEQ ID 233 | spr0565A | SEQ ID 235 | His ₆ | 213 |
| MAS | RrgA | SEQ ID 233 | spr0565B | SEQ ID 235 | His ₆ | 214 |
| MAS | RrgA | SEQ ID 233 | spr0057 | LE | His ₆ | 215 |
| MAS | RrgA | SEQ ID 233 | spr0096 | LE | His ₆ | 216 |
| MAS | spr0565 | SEQ ID 233 | spr0057 | SEQ ID 235 | His ₆ | 217 |
| MAS | spr0565A | SEQ ID 233 | spr0057 | SEQ ID 235 | His ₆ | 218 |
| MAS | spr0565B | SEQ ID 233 | spr0057 | LE | His ₆ | 219 |
| MAS | spr0565 | SEQ ID 233 | spr0096 | LE | His ₆ | 220 |
| MAS | spr0565A | SEQ ID 233 | spr0096 | LE | His ₆ | 221 |
| MAS | spr0565B | SEQ ID 233 | spr0096 | LE | His ₆ | 222 |
| MAS | spr0565 | SEQ ID 233 | spr2021 | SEQ ID 235 | His ₆ | 223 |

(continuación)

| A | X ₁ | L ₁ | X ₂ | L ₂ | B | SEQ ID |
|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|--------|
| MAS | spr0565A | SEQ ID 233 | spr2021 | SEQ ID 235 | His ₆ | 224 |
| MAS | spr0565B | SEQ ID 233 | spr2021 | SEQ ID 235 | His ₆ | 225 |
| MAS | spr0565 | SEQ ID 233 | RrgA | LE | His ₆ | 226 |
| MAS | spr0565A | SEQ ID 233 | RrgA | LE | His ₆ | 227 |
| MAS | spr0565B | SEQ ID 233 | RrgA | LE | His ₆ | 228 |

Los restos X₁ y X₂ de estos híbridos se pueden usar en híbridos adicionales.

5 Como se ha mencionado anteriormente, el polipéptido spr0057 muestra actividad enzimática usando un sustrato de 4-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida. Esta actividad enzimática se conservó en diversos polipéptidos híbridos (spr0096-spr0057; spr2021-spr0057; spr0057-spr2021; y spr0057-spr0096).

10 Una combinación de spr0057 y spr0096 se comparó con un polipéptido spr0057-spr0096 híbrido en ensayos inmunológicos. Como se muestra en las Figuras 28-31, el híbrido presentaba una eficacia igual o superior a la de la combinación. La diferencia más elevada se observó en la mortalidad después de inmunización i.p. y posterior estimulación i.v. con TIGR4 usando 5,8 x 10⁶ cfu (Figura 31).

Referencias

- [1] WO 02/22168.
 [2] Ogunniyi y col. (2007) Infect Immun. 75 (1): 350-7.
 [3] WO 02/079241
 15 [4] WO 02/34773.
 [5] WO 00/06737.
 [6] WO 00/06738.
 [7] WO 00/58475.
 [8] WO 2003/082183.
 20 [9] Bagnoli y col. (2008) J Bacteriol. 190 (15): 5480-92.
 [10] WO 2004/092209.
 [11] Divulgación de Investigación, 453077 (Enero de 2002).
 [12] EP-A-0372501.
 [13] EP-A-0378881.
 25 [14] EP-A-0427347.
 [15] WO 93/17712.
 [16] WO 94/03208.
 [17] WO 98/58668.
 [18] EP-A-0471177.
 30 [19] WO 91/01146.
 [20] Falugi y col. (2001) Eur J Immunol 31: 3816-3824.
 [21] Baraldo y col. (2004) Infect Immun 72 (8): 4884-7.
 [22] EP-A-0594610.
 [23] Ruan y col. (1990) J Immunol 145: 3379-3384.
 35 [24] WO 00/56360.
 [25] Kuo y col. (1995) Infect Immun 63: 2706-13.
 [26] Michon y col. (1998) Vaccine. 16: 1732-41.
 [27] WO 02/091998.
 [28] WO 01/72337.
 40 [29] WO 00/61761.
 [30] WO 00/33882
 [31] WO 2007/071707
 [32] WO 99/42130.
 [33] patente de Estados Unidos n.º 4,761,283.
 45 [34] patente de Estados Unidos n.º 4,356,170.
 [35] patente de Estados Unidos n.º 4,882,317.
 [36] patente de Estados Unidos n.º 4,695,624.
 [37] Mol. Immunol., 1985, 22, 907-919
 [38] EP-A-0208375.
 50 [39] Bethell G.S. y col., J. Biol. Chem., 1979, 254, 2572-4

- [40] Hearn M.T.W., J. Chromatogr., 1981, 218, 509-18
 [41] WO 00/10599.
 [42] Gevert y col., Med. Microbiol. Immunol, 165 : 171-288 (1979).
 [43] patente de Estados Unidos n.º 4.057.685.
 5 [44] patente de Estados Unidos n.º 4.673.574; 4.761.283; 4.808.700.
 [45] patente de Estados Unidos n.º 4.459.286.
 [46] patente de Estados Unidos n.º 4.965.338.
 [47] patente de Estados Unidos n.º 4.663.160.
 [48] WO 2007/000343.
 10 [49] Vaccines. (eds. Plotkin y Orenstein). 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0.
 [50] Rappuoli y col. (1991) TIBTECH 9: 232-238.
 [51] Kirkham y col. (2006) Infect Immun. 74 (1): 586-93.
 [52] WO 2005/108580.
 15 [53] Berry y col. (1999) Infect Immun 67 (2): 981-5.
 [54] US-6716432.
 [55] WO 90/06951.
 [56] WO 99/03884.
 [57] Baba y col. (2002) Infect Immun 70: 107-113.
 [58] US-7217791
 20 [59] WO 2008/061953.
 [60] Cao y col. (2007) Vaccine 25 (27): 4996-5005.
 [61] WO 2005/063283.
 [62] WO 2003/104272.
 [63] WO 00/37105.
 25 [64] Adamou y col. (2001) Infect Immun. 69 (2): 949-58.
 [65] WO 98/18930.
 [66] WO 99/53940.
 [67] WO 02/22167.
 [68] WO 02/08426.
 30 [69] WO 01/12219.
 [70] Briles y col. (2000) J Infect Dis 182: 1694-1701.
 [71] Talkington y col. (1996) Microb Pathog. 21 (1): 17-22.
 [72] WO 00/76540.
 [73] Bethe y col. (2001) FEMS Microbiol Lett. 205 (1): 99-104.
 35 [74] WO 01/81380.
 [75] Brown y col. (2001) Infect Immun 69: 6702-6.
 [76] Whalan y col. (2005) FEMS Immunol Med Microbiol 43: 73-80.
 [77] Jomaa y col. (2006) Vaccine. 24 (24): 5133-9.
 [78] Giefing y col. (2008) J Exp Med 205: 117-131.
 40 [79] WO 2007/116322.
 [80] LeMieux y col. (2006) Infect Immun 74: 2453-6.
 [81] Nelson y col. (2007) Mol Microbiol 66: 329-40.
 [82] patente de Estados Unidos n.º 5.707.829
 [83] Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel y col. eds., 1987) Suplemento 30.
 45 [84] Hoskins y col. (2001) J.Bacteriol. 183:5709-5717.
 [85] GenBank NC_004512.
 [86] GenBank NC_003440.
 [87] GenBank NC_003028.
 [88] Tettelin y col. (2001) Science 293: 498-506.
 50 [89] WO 02/077021.
 [90] Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453.
 [91] Rice y col. (2000) Trends Genet 16: 276-277.
 [92] patente de Estados Unidos n.º 6355271.
 [93] WO 00/23105.
 55 [94] Vaccine Design... (1995) eds. Powell y Newman. ISBN: 030644867X. Plenum.
 [95] WO 90/14837.
 [96] WO 90/14837.
 [97] Podda y Del Giudice (2003) Expert Rev Vaccines 2: 197-203.
 [98] Podda (2001) Vaccine 19: 2673-2680.
 60 [99] Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach (eds. Powell y Newman) Plenum Press 1995 (ISBN 0-306-44867-X).
 [100] Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Volumen 42 de Methods in Molecular Medicine series). ISBN: 1-59259-083-7. Ed. O'Hagan.
 [101] WO 2008/043774.
 65 [102] Allison y Byars (1992) Res Immunol 143: 519-25.
 [103] Hariharan y col. (1995) Cancer Res 55: 3486-9.

- [104] US-2007/014805.
 [105] US-2007/0191314.
 [106] Suli y col. (2004) Vaccine 22 (25-26): 3464-9.
 [107] WO 95/11700.
 5 [108] patente de Estados Unidos n.º 6.080.725.
 [109] WO 2005/097181.
 [110] WO 2006/113373.
 [111] Han y col. (2005) Impact of Vitamin E on Immune Function and Infectious Diseases in the Aged at Nutrition, Immune functions and Health EuroConference, Paris, 9-10 de junio de 2005.
 10 [112] US- 6630161.
 [113] patente de Estados Unidos n.º 5.057.540.
 [114] WO 96/337
 [115] EP-A-0109942.
 [116] WO 96/11711.
 15 [117] WO 00/07621.
 [118] Barr y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32: 247-271.
 [119] Sjolanderet y col. (1998) Advanced Drug Delivery Reviews 32: 321-338.
 [120] Niikura y col. (2002) Virology 293: 273-280.
 [121] Lenz y col. (2001) J Immunol 166: 5346-5355.
 20 [122] Pinto y col. (2003) J Infect Dis 188: 327-338.
 [123] Gerber y col. (2001) J Virol 75: 4752-4760.
 [124] WO 03/024480.
 [125] WO 03/024481.
 [126] Gluck y col. (2002) Vaccine 20: B10-B16.
 25 [127] EP-A-0689454.
 [128] Johnson y col. (1999) Bioorg Med Chem Lett 9: 2273-2278.
 [129] Evans y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2: 219-229.
 [130] Meraldi y col. (2003) Vaccine 21: 2485-2491.
 [131] Pajak y col. (2003) Vaccine 21: 836-842.
 30 [132] Kandimalla y col. (2003) Nucleic Acids Research 31: 2393-2400.
 [133] WO 02/26757.
 [134] WO 99/62923.
 [135] Krieg (2003) Nature Medicine 9: 831-835.
 [136] McCluskie y col. (2002) FEMS Immunology and Medical Microbiology 32: 179-185.
 35 [137] WO 98/40100.
 [138] patente de Estados Unidos n.º 6.207.646.
 [139] patente de Estados Unidos n.º 6.239.116.
 [140] patente de Estados Unidos n.º 6.429.199.
 [141] Kandimalla y col. (2003) Biochemical Society Transactions 31 (parte 3): 654-658.
 40 [142] Blackwell y col. (2003) J Immunol 170: 4061-4068.
 [143] Krieg (2002) Trends Immunol 23: 64-65.
 [144] WO 01/9593
 [145] Kandimalla y col. (2003) BBRC 306: 948-953.
 [146] Bhagat y col. (2003) BBRC 300: 853-861.
 45 [147] WO 03/035836.
 [148] WO 01/2297
 [149] Schellack y col. (2006) Vaccine 24: 5461-72.
 [150] Kamath y col. (2008) Eur J Immunol 38: 1247-56.
 [151] Riedl y col. (2008) Vaccine 26: 3461-8.
 50 [152] WO 95/17211.
 [153] WO 98/42375.
 [154] Beignon y col. (2002) Infect Immun 70: 3012-3019.
 [155] Pizza y col. (2001) Vaccine 19: 2534-2541.
 [156] Pizza y col. (2000) Int J Med Microbiol 290: 455-461.
 55 [157] Scharton-Kersten y col. (2000) Infect Immun 68: 5306-5313.
 [158] Ryan y col. (1999) Infect Immun 67: 6270-6280.
 [159] Partidos y col. (1999) Immunol Lett 67: 209-216.
 [160] Peppoloni y col. (2003) Expert Rev Vaccines 2: 285-293.
 [161] Pine y col. (2002) J Control Release 85: 263-270.
 60 [162] Tebbey y col. (2000) Vaccine 18: 2723-34.
 [163] Domenighini y col. (1995) Mol Microbiol 15: 1165-1167.
 [164] WO 99/40936.
 [165] WO 99/44636.
 [166] Singh y col. (2001) J Cont Release 70: 267-276.
 65 [167] WO 99/27960.
 [168] patente de Estados Unidos n.º 6.090.406.

- [169] patente de Estados Unidos n.º 5.916.588.
 [170] EP-A-0626169.
 [171] WO 99/52549.
 [172] WO 01/21207.
 5 [173] WO 01/21152.
 [174] Andrianov y col. (1998) *Biomaterials* 19: 109-115.
 [175] Payne y col. (1998) *Adv Drug Delivery Review* 31: 185-196.
 [176] patente de Estados Unidos n.º 4.680.338.
 [177] patente de Estados Unidos n.º 4.988.815.
 10 [178] WO 92/15582.
 [179] Stanley (2002) *Clin Exp Dermatol* 27: 571-577.
 [180] Wu y col. (2004) *Antiviral Res.* 64 (2): 79-83.
 [181] Vasilakos y col. (2000) *Cell Immunol.* 204 (1): 64-74.
 15 [182] patentes de Estados Unidos n.ºs 4689338, 4929624, 5238944, 5266575, 5268376, 5346905, 5352784, 5389640, 5395937, 5482936, 5494916, 5525612, 6083505, 6440992, 6627640, 6656938, 6660735, 6660747, 6664260, 6664264, 6664265, 6667312, 6670372, 6677347, 6677348, 6677349, 6683088, 6703402, 6743920, 6800624, 6809203, 6888000 y 6924293.
 [183] Jones (2003) *Curr Opin Investig Drugs* 4: 214-218.
 [184] WO 03/011223.
 20 [185] Johnson y col. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2273-2278.
 [186] Evans y col. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2: 219-229.
 [187] WO 2004/060308.
 [188] WO 2004/064759.
 25 [189] patente de Estados Unidos n.º 6.924.271.
 [190] US2005/0070556.
 [191] patente de Estados Unidos n.º 5.658.731.
 [192] patente de Estados Unidos n.º 5.011.828.
 [193] WO 2004/87153.
 30 [194] patente de Estados Unidos n.º 6.605.617.
 [195] WO 02/18383.
 [196] WO 2004/018455.
 [197] WO 03/082272.
 [198] Wong y col. (2003) *J Clin Pharmacol* 43 (7): 735-42.
 [199] US2005/0215517.
 35 [200] Dyakonova y col. (2004) *Int Immunopharmacol* 4 (13): 1615-23.
 [201] FR-2859633.
 [202] Signorelli y Hadden (2003) *Int Immunopharmacol* 3 (8): 1177-86.
 [203] WO 2004/064715.
 [204] De Libero y col. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5: 485-496
 40 [205] patente de Estados Unidos n.º 5.936.076.
 [206] Oki y col. *J. Clin. Investig.*, 113: 1631-1640
 [207] US2005/0192248
 [208] Yang y col. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 3818-3822
 [209] WO 2005/102049
 45 [210] Goff y col. *J. Am. Chem., Soc.*, 2004, 126: 13602-13603
 [211] WO 03/105769
 [212] Cooper (1995) *Pharm Biotechnol* 6: 559-80.
 [213] WO 99/11241.
 [214] WO 94/00153.
 50 [215] WO 98/57659.
 [216] solicitudes de patentes de europea n.ºs 0835318, 0735898 y 0761231.
 [217] WO 2006/11060
 [218] Zwijnenburg y col. (2001) *J Infect Dis* 183: 1143-6.
 [219] Donnelly y col. (1997) *Annu Rev Immunol* 15: 617-648.
 55 [220] Strugnelli y col. (1997) *Immunol Cell Biol* 75 (4): 364-369.
 [221] Cui (2005) *Adv Genet* 54: 257-89.
 [222] Robinson y Torres (1997) *Seminars in Immunol* 9: 271-283.
 [223] Brunham y col. (2000) *J Infect Dis* 181 Suppl 3: S538-43.
 [224] Svanholm y col. (2000) *Scy J Immunol* 51 (4): 345-53.
 60 [225] *DNA Vaccination - Genetic Vaccination* (1998) eds. Koprowski y col. (ISBN 3540633928).
 [226] *Gene Vaccination: Theory and Practice* (1998) ed. Raz (ISBN 3540644288).
 [227] Ferreira y col. (2006) *J Med Microbiol.* 55 (Pt 4): 375-8.
 [228] Findeis y col., *Trends Biotechnol.* (1993) 11: 202
 [229] Chiou y col. (1994) *Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer.* ed. Wolff
 65 [230] Wu y col., *J. Biol. Chem.* (1988) 263: 621
 [231] Wu y col., *J. Biol. Chem.* (1994) 269: 542

- [232] Zenke y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1990) 87: 3655
 [233] Wu y col., J. Biol. Chem. (1991) 266: 338
 [234] Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1: 51
 [235] Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5: 845
 5 [236] Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1: 185
 [237] Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6: 148
 [238] WO 90/07936.
 [239] WO 94/03622.
 [240] WO 93/25698.
 10 [241] WO 93/25234.
 [242] patente de Estados Unidos n.º 5.219.740.
 [243] WO 93/11230.
 [244] WO 93/10218.
 [245] patente de Estados Unidos n.º 4.777.127.
 15 [246] Patente de GB n.º 2.200.651.
 [247] EP-A-0345242.
 [248] WO 91/02805.
 [249] WO 94/12649.
 [250] WO 93/03769.
 20 [251] WO 93/19191.
 [252] WO 94/28938.
 [253] WO 95/11984.
 [254] WO 95/00655.
 [255] Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3: 147
 25 [256] Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264: 16985
 [257] patente de Estados Unidos n.º 5.814.482.
 [258] WO 95/07994.
 [259] WO 96/17072.
 [260] WO 95/30763.
 30 [261] WO 97/42338.
 [262] WO 90/11092.
 [263] patente de Estados Unidos n.º 5.580.859
 [264] patente de Estados Unidos n.º 5.422.120
 [265] WO 95/13796.
 35 [266] WO 94/23697.
 [267] WO 91/14445.
 [268] EP-0524968.
 [269] Philip, Mol. Cell Biol. (1994) 14: 2411
 [270] Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91: 11581
 40 [271] patente de Estados Unidos n.º 5.206.152.
 [272] WO 92/11033.
 [273] patente de Estados Unidos n.º 5.149.655.
 [274] Brandt y col. (2006) J Antimicrob Chemother. 58 (6): 1291-4. Epub 26 Oct 2006
 [275] Winter y col., (1991) Nature 349: 293-99
 45 [276] patente de Estados Unidos n.º 4.816.567.
 [277] Inbar y col., (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69: 2659-62.
 [278] Ehrlich y col., (1980) Biochem 19: 4091-96.
 [279] Huston y col., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5897-83.
 [280] Pack y col., (1992) Biochem 31, 1579-84.
 50 [281] Cumber y col., (1992) J. Immunology 149B, 120-26.
 [282] Riechmann y col., (1988) Nature 332, 323-27.
 [283] Verhoeyan y col., (1988) Science 239, 1534-36.
 [284] documento de patente GB 2.276.169.
 [285] Gennaro (2000) Remington: The Science and Practise of Pharmacy. 20ª edición, ISBN: 0683306472.
 55 [286] Methods In Enzymology (S. Colowick y N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.)
 [287] Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds, 1986, Blackwell Scientific Publications)
 [288] Sambrook y col. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
 60 [289] Handbook of Surface and Colloidal Chemistry (Birdi, K.S. ed., CRC Press, 1997)
 [290] Ausubel y col. (eds) (2002) Short protocols in molecular biology, 5ª edición (Current Protocols).
 [291] Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, (Ream y col., eds., 1998, Academic Press)
 [292] PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed. (Newton y Graham eds., 1997, Springer Verlag)
 [293] Geysen y col. (1984) PNAS USA 81: 3998-4002.
 65 [294] Carter (1994) Methods Mol Biol 36: 207-23.
 [295] Jameson, BA y col. 1988, CABIOS 4 (1): 181-186.

- [296] Radrizzani y Hammer (2000) *Brief Bioinform* 1 (2): 179-89.
- [297] Bublilo y col. (2007) *Proteins* 68 (1): 294-304.
- [298] De Lalla y col. (1999) *J. Immunol.* 163: 1725-29.
- [299] Kwok y col. (2001) *Trends Immunol* 22: 583-88.
- 5 [300] Brusica y col. (1998) *Bioinformatics* 14 (2): 121-30
- [301] Meister y col. (1995) *Vaccine* 13 (6): 581-91.
- [302] Roberts y col. (1996) *AIDS Res Hum Retroviruses* 12 (7): 593-610.
- [303] Maksyutov y Zagrebelnaya (1993) *Comput Appl Biosci* 9 (3): 291-7.
- [304] Feller y de la Cruz (1991) *Nature* 349 (6311): 720-1.
- 10 [305] Hopp (1993) *Peptide Research* 6: 183-190.
- [306] Welling y col. (1985) *FEBS Lett.* 188: 215-218.
- [307] Davenport y col. (1995) *Immunogenetics* 42: 392-297.
- [308] Tsurui y Takahashi (2007) *J Pharmacol Sci.* 105 (4): 299-316.
- [309] Tong y col. (2007) *Brief Bioinform.* 8 (2): 96-108.
- 15 [310] Schirle y col. (2001) *J Immunol Methods.* 257 (1-2): 1-16.
- [311] Chen y col. (2007) *Amino Acids* 33 (3): 423-8.
- [312] *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel y col., eds., 1987) Suplemento 30
- [313] Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489.
- [314] King y col. (2006) *Mol Microbiol* 59 (3): 961-74.
- 20 [315] Zysk y col. (2000) *Infect Immun* 68: 3740-3.
- [316] Wellmer y col. (2002) *Infect Immun* 70: 6504-8.
- [317] Gosink y col. (2000) *Infect Immun* 68 (10): 5690-5.
- [318] Wizemann y col. (2001) *Infect Immun* 69: 1593-8.
- [319] Moscoso y col. (2005) *Appl Environ Microbiol* 71: 8706-13.
- 25 [320] Kharat y Tomasz (2003) *Infect Immun* 71: 2758-65.
- [321] Chen y col. (2005) *FEMS Microbiol Lett.* 253 (1): 151-4.
- [322] Bumbaca y col. (2007) *Proteins.* 66 (3): 547-58.
- [323] Monterroso y col. (2005) *Biochem J.* 391: 41-9.
- [324] Moscoso y col. (2005) *J Bacteriology* 187: 6238-41.
- 30 [325] Ogunniyi y col. (2001) *Infect Immun* 69: 5997-6003.
- [326] Ng y col. (2005) *J Bacteriol.* 187(21): 7444-59.
- [327] Mills y col. (2007) *J Bacteriol.* 189: 4544-6.
- [328] WO 2008/079732.

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica que comprende una combinación de antígenos de *S. pneumoniae*, comprendiendo dicha combinación un antígeno spr0096 y un antígeno spr2021, en la que:

5 dicho antígeno spr0096 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 12; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 12; y dicho antígeno spr2021 es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 11; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 11.

10 2. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende uno o más antígenos seleccionados entre el grupo que consiste en:

- (1) un antígeno spr1739 que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 10; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 10;
- 15 (2) un antígeno spr0867 que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 8; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 8;
- (3) un antígeno spr1431 que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 9; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 9;
- 20 (4) un antígeno spr1433 que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 13; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 13;
- (5) un antígeno spr1707 que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 14; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 14;
- 25 (6) un antígeno spr0057 que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 1; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 1;
- 30 (7) un antígeno spr0565 que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 3; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 3;
- (8) un antígeno spr1345 que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 5; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 5;
- 35 (9) un antígeno spr1416 que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 6; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 6;
- (10) un antígeno spr1418 que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 7; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 8;
- 40 (11) un antígeno spr1098 que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 4; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 4; y/o
- 45 (12) un antígeno spr0286 que comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 2; y/o (b) que comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 2;

en la que preferentemente, el uno o más antígenos se selecciona(n) entre el grupo que consiste en: (1) antígeno spr1739; (2) un antígeno spr0867; (3) un antígeno spr1431; (4) un antígeno spr1433; y/o (5) un antígeno spr1707.

50 3. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un antígeno spr0057 y/o un antígeno spr0565.

4. La composición de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente uno o más de:

- (a) un antígeno de pilus RrgA y/o RrgB de *S. pneumoniae*;
- (b) un antígeno Pmp de *S. pneumoniae*; y/o
- 55 (c) uno o más conjugados de un sacárido capsular neumocócico y una proteína vehículo, en los que (i) el sacárido capsular es de uno o más de los siguientes serotipos neumocócicos: 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F and 23F; y (ii) la proteína vehículo es una toxina o toxoide bacteriano, o es proteína D de *H. influenzae*.

en la que:

dicho antígeno RrgA comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 172 o 179; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 172 o 179;

5 dicho antígeno RrgB comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 173, 174 o 175; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 173, 174, o 175; y/o

dicho antígeno Pmp comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 28; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 28.

10 5. Una composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende:

(a) uno o más conjugados de un sacárido capsular neumocócico y una proteína vehículo;

15 (b) uno o más antígeno(s) seleccionados entre el grupo que consiste en: toxoide de difteria; toxoide del tétanos; antígeno de superficie del virus de la hepatitis B; un antígeno del virus de la polio inactivado; uno o más antígenos de pertussis acelulares; un conjugado del antígeno de sacárido capsular del tipo B de *H. influenzae*; un conjugado del antígeno de sacárido capsular del serogrupo C de *N. meningitidis*; un conjugado del antígeno de sacárido capsular del serogrupo Y de *N. meningitidis*; un conjugado del antígeno de sacárido capsular del serogrupo W135 de *N. meningitidis*; y un conjugado del antígeno de sacárido capsular del serogrupo A de *N. meningitidis*; o

(c) un agente protector de temperatura que mejora la estabilidad térmica de la composición.

20 6. Un polipéptido de fórmula $\text{NH}_2\text{-A-}\{-\text{X-L}\}_n\text{-B-COOH}$, en la que:

X es una secuencia de aminoácidos de un antígeno neumocócico, seleccionado entre el grupo que consiste en: (1) un antígeno spr0057; (2) un antígeno spr0096; (3) un antígeno spr0565; y (4) un antígeno spr2021; (5) un antígeno RrgA; y (6) un antígeno RrgB;

25 L es una secuencia de aminoácidos de engarce opcional;

A es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional;

B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional,

n es un número entero de 2 o más; y

al menos un ejemplo de X es spr0096 y al menos un ejemplo de X es spr2021;

en el que:

30 dicho antígeno spr0057 comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 1; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 1;

35 dicho antígeno spr0096 comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 12; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 12;

dicho antígeno spr0565 comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 3; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 3;

40 dicho antígeno spr2021 comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 11; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 11;

dicho antígeno RrgA comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 172 or 179; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 172 or 179; y/o

45 dicho antígeno RrgB comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 173, 174 or 175; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 173, 174, o 175.

7. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 6, que tiene la fórmula $\text{NH}_2\text{-A-X}_1\text{-L}_1\text{-X}_2\text{-L}_2\text{-B-COOH}$, en la que:

50 (a) X_1 es una secuencia de aminoácidos de un antígeno spr0096 neumocócico y X_2 es una secuencia de aminoácidos de un antígeno spr2021 neumocócico; o

(b) X_1 es una secuencia de aminoácidos de un antígeno spr2021 neumocócico y X_2 es una secuencia de aminoácidos de un antígeno spr0096 neumocócico;

L es una secuencia de aminoácidos de engarce opcional;

A es una secuencia de aminoácidos N-terminal opcional;

55 B es una secuencia de aminoácidos C-terminal opcional;

y en el que:

dicho antígeno spr0096 comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 12; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que

comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 12; y/o

dicho antígeno spr2021 comprende una secuencia de aminoácidos: (a) que tiene una identidad de un 80 % o superior con la SEQ ID NO: 11; y/o (b) comprende un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos, que comprende un epítipo de la SEQ ID NO: 11.

- 5 8. El polipéptido de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que al menos una secuencia L comprende Gly_x, en la que x = 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.
9. El polipéptido de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 194 y 205.
- 10 10. Un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de un 75 % o superior con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 194 y 205.
11. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10.
12. Ácido nucleico que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10.
13. La composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 u 11 para su uso en un procedimiento para aumentar una respuesta inmune en un mamífero.
- 15 14. La composición inmunogénica de la reivindicación 13 para su uso en protección de dicho mamífero frente a infección neumocócica.

FIGURA 1

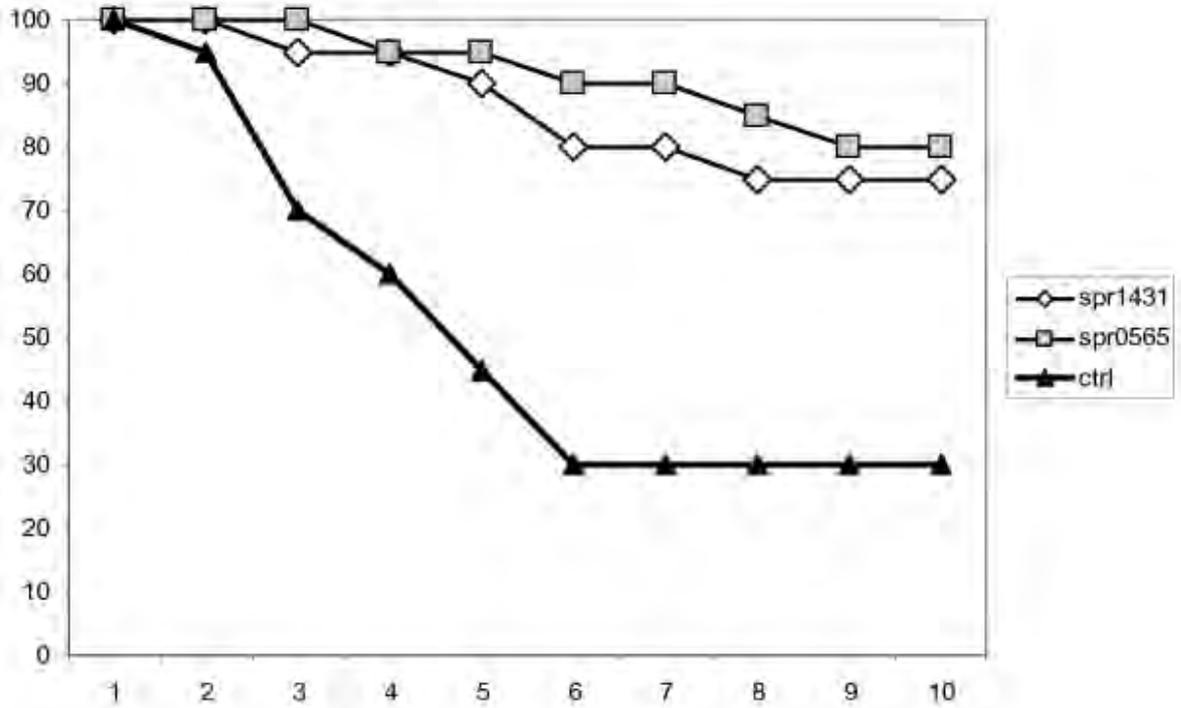


FIGURA 2

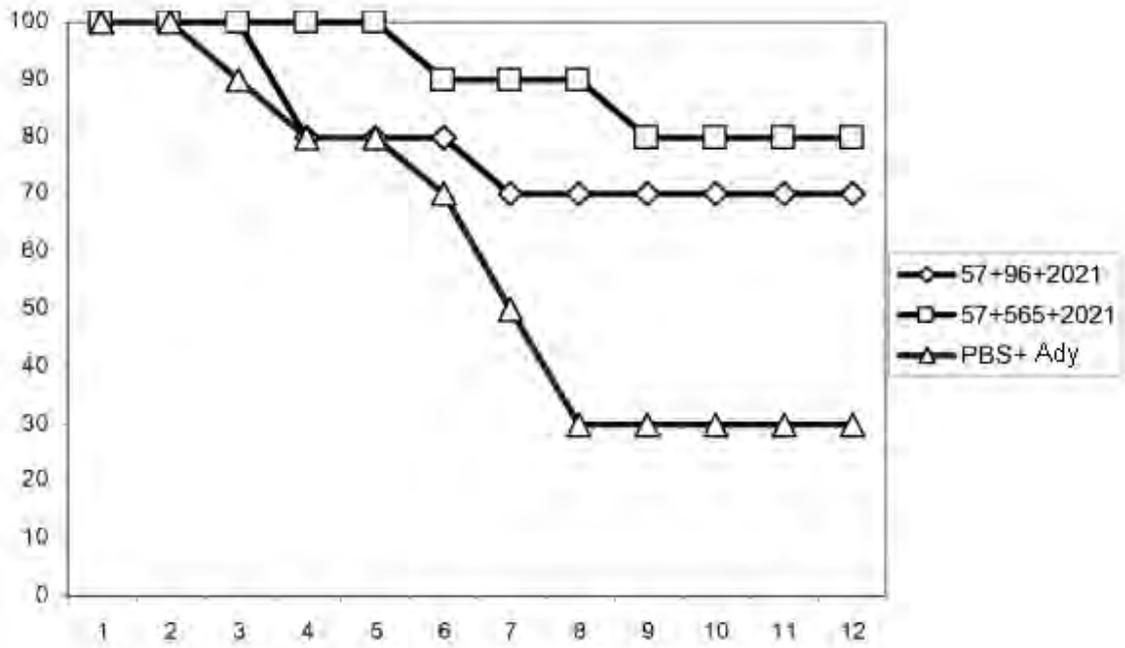
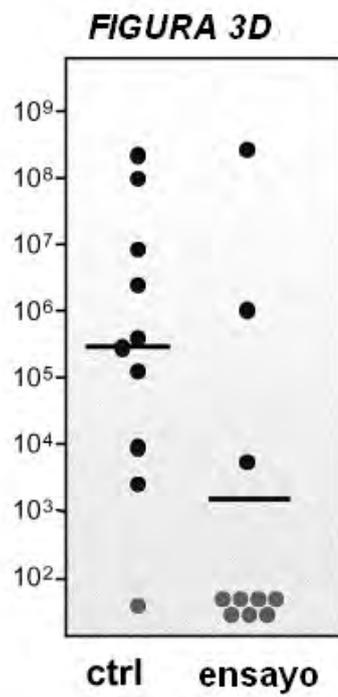
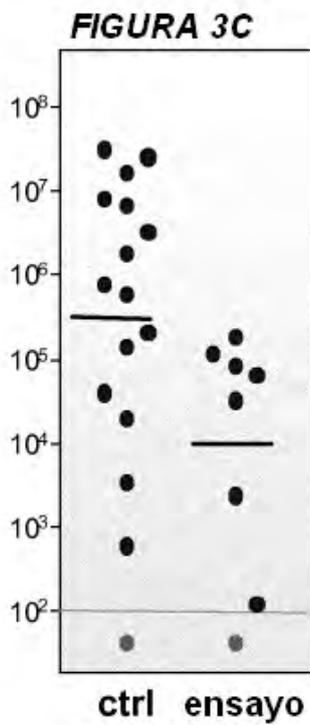
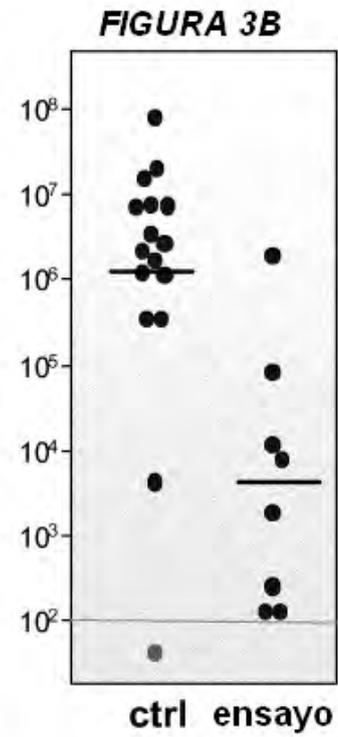
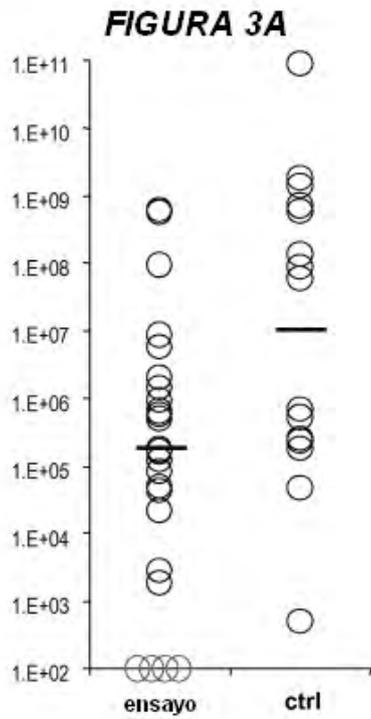


FIGURA 3



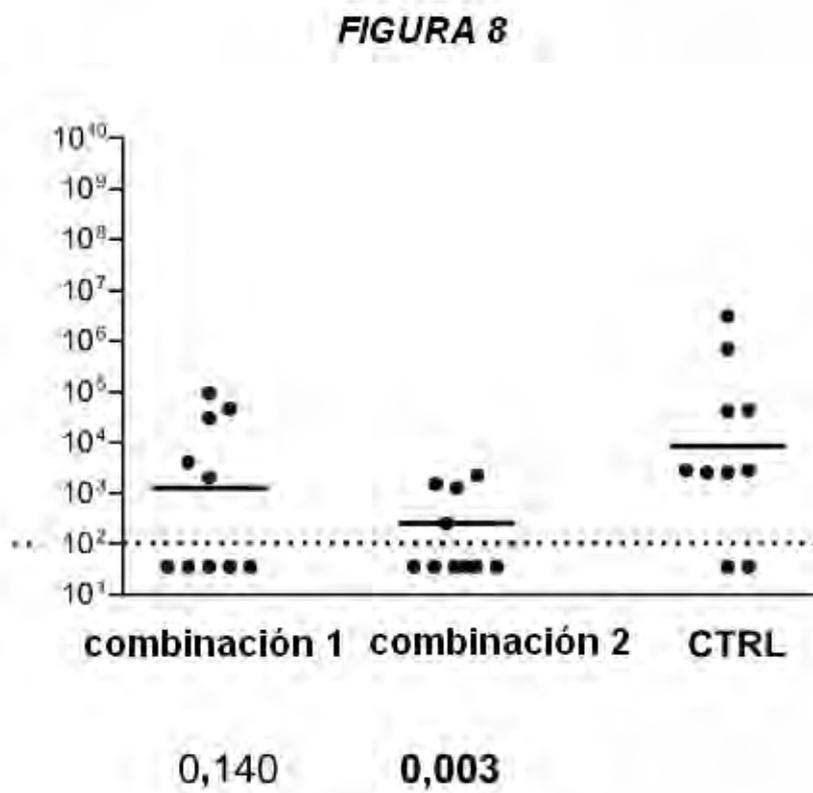
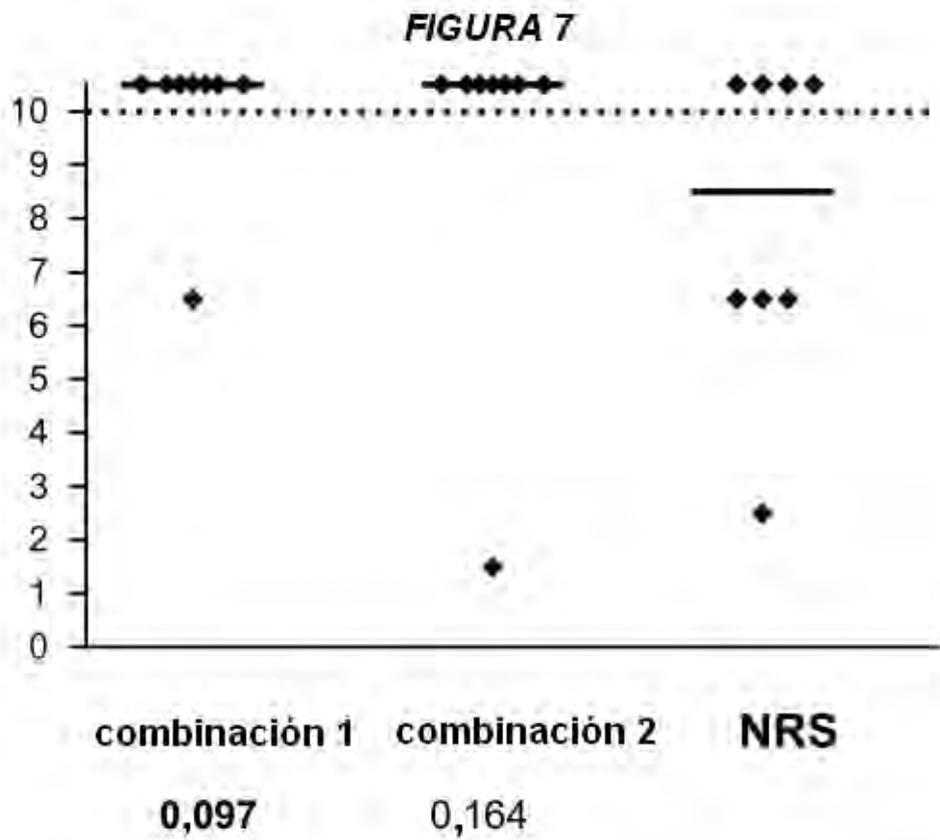


FIGURA 11

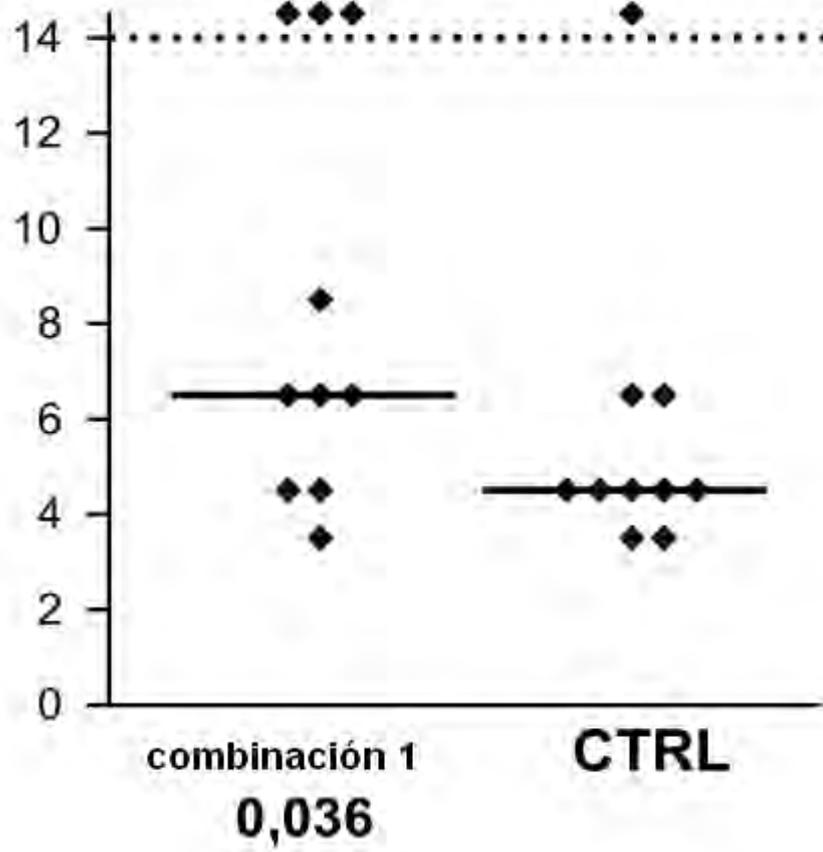


FIGURA 12

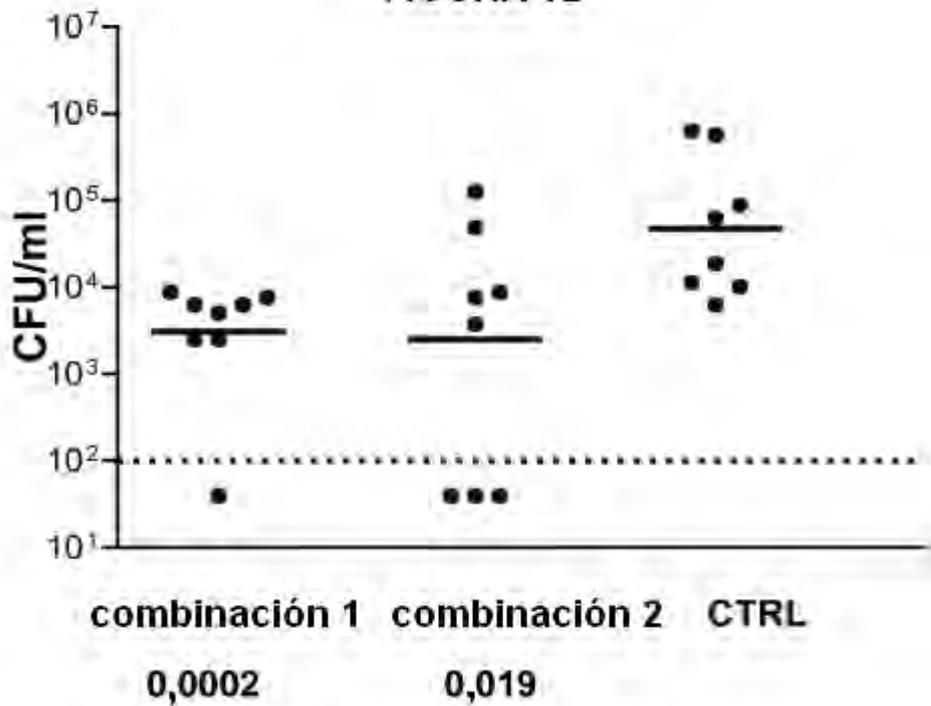
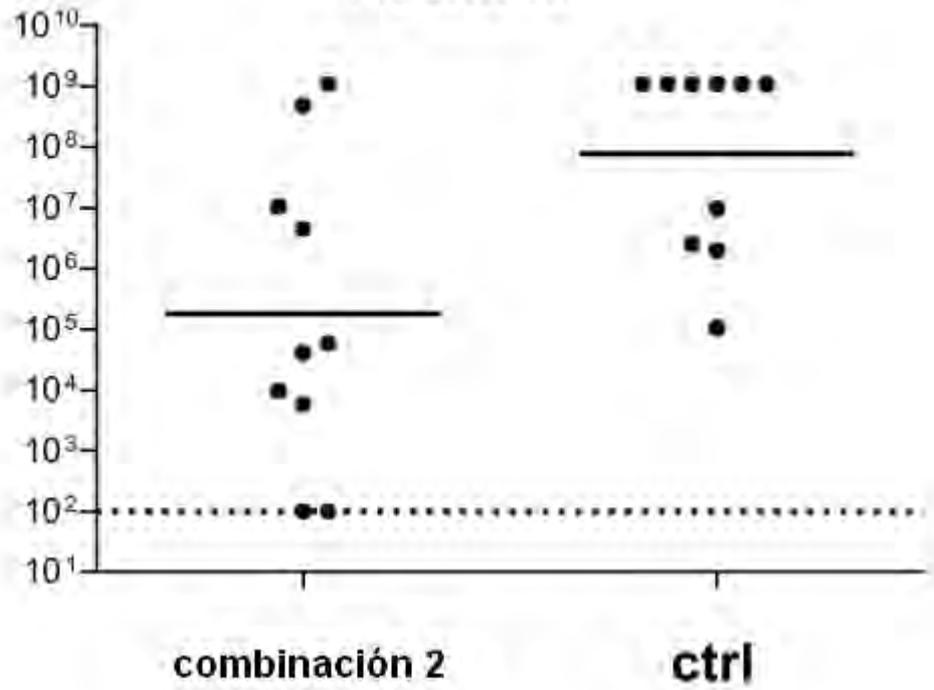
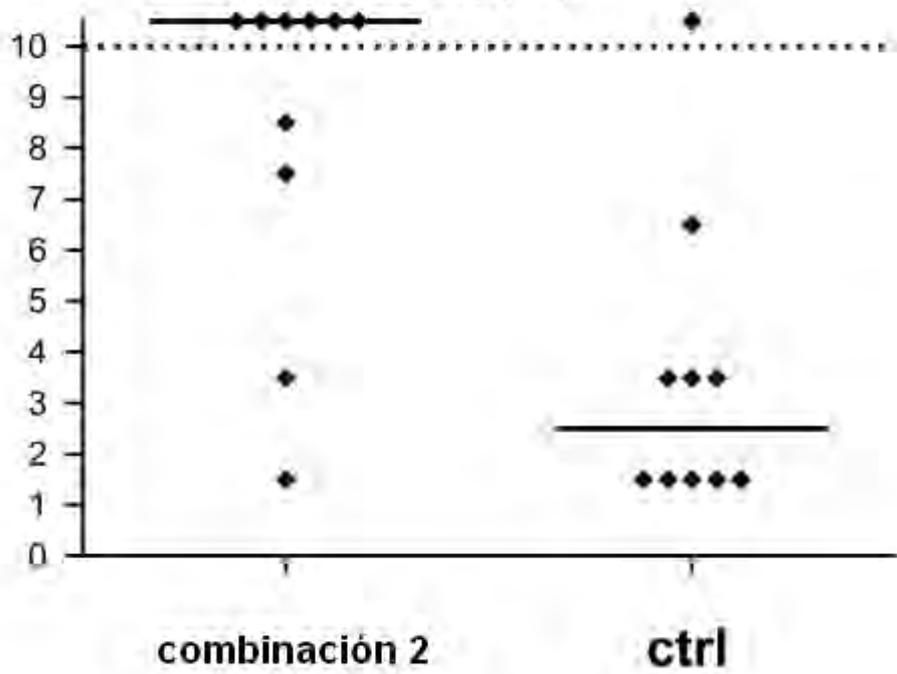


FIGURA 13



0,007

FIGURA 14



0,004

FIGURA 15

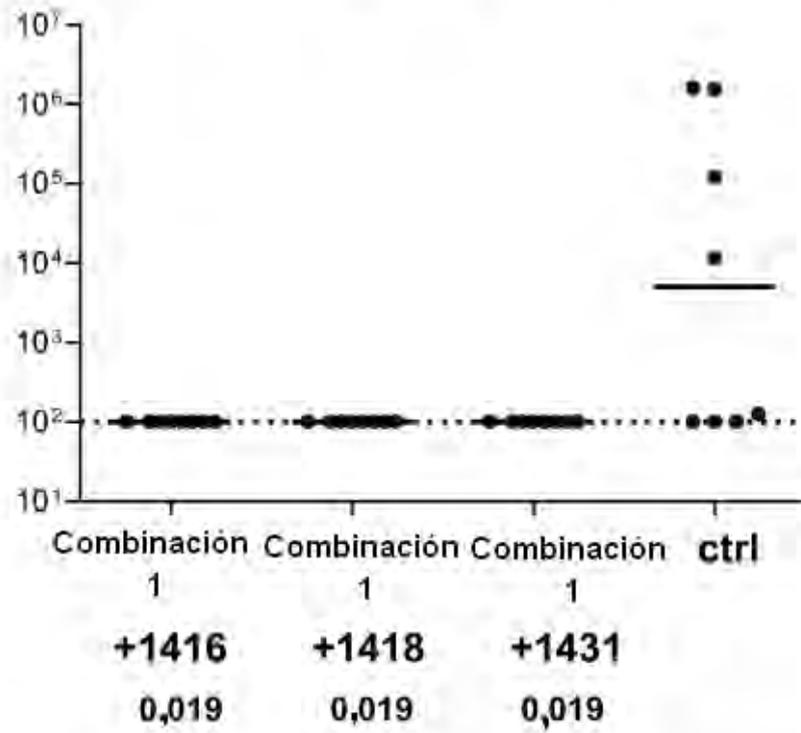


FIGURA 16

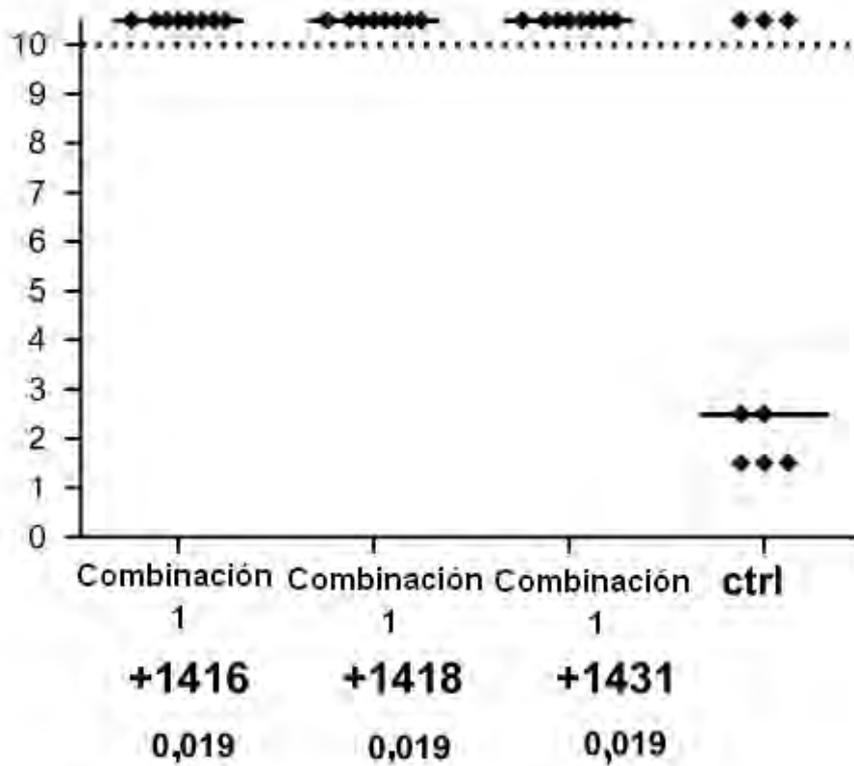
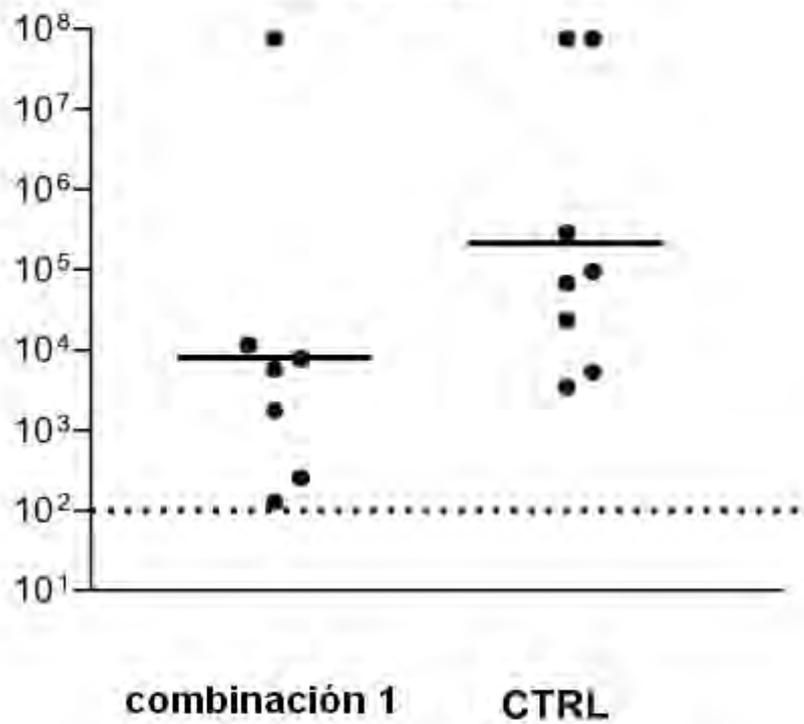
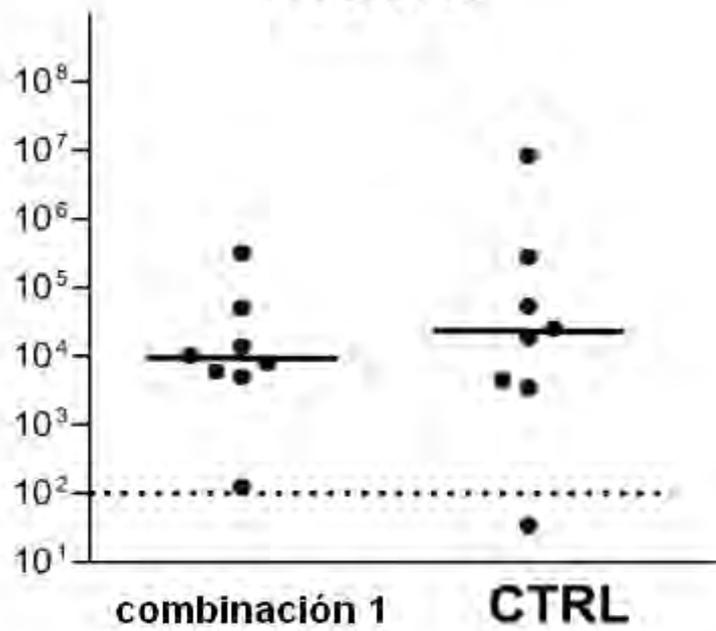


FIGURA 17



0,047

FIGURA 18



0,360

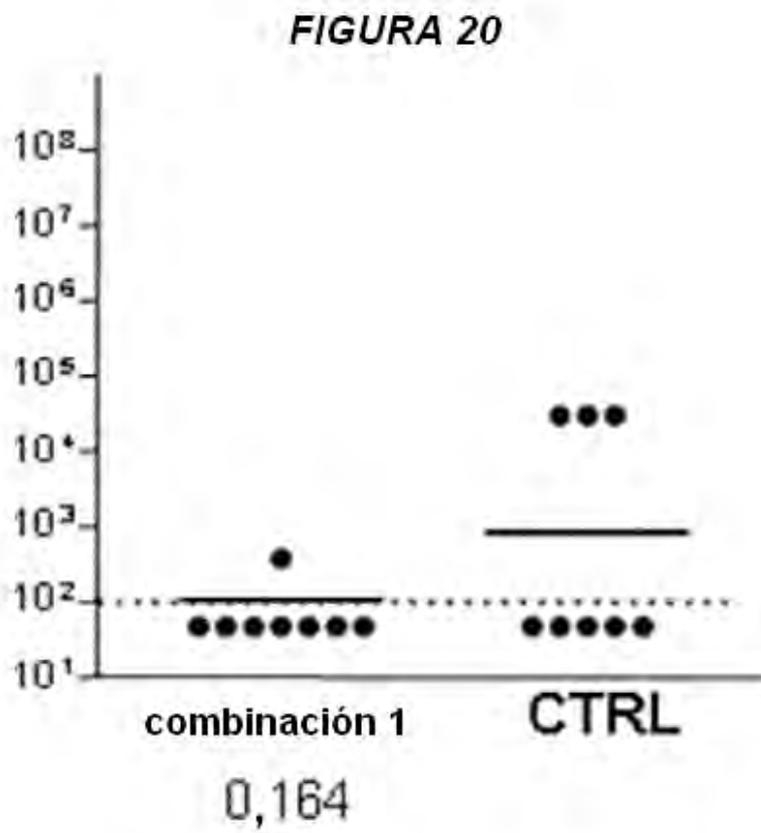
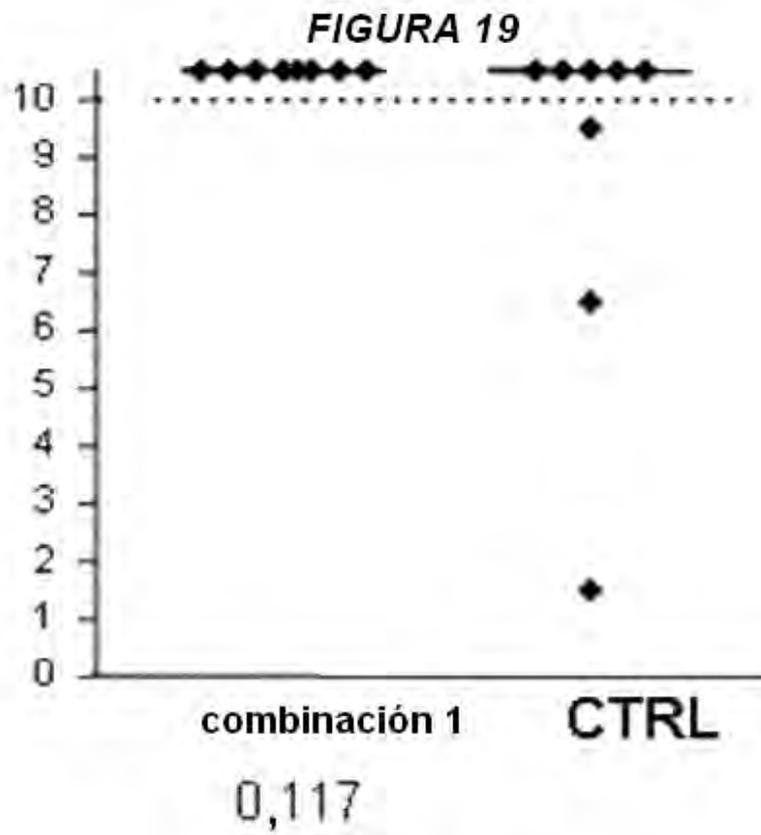


FIGURA 21

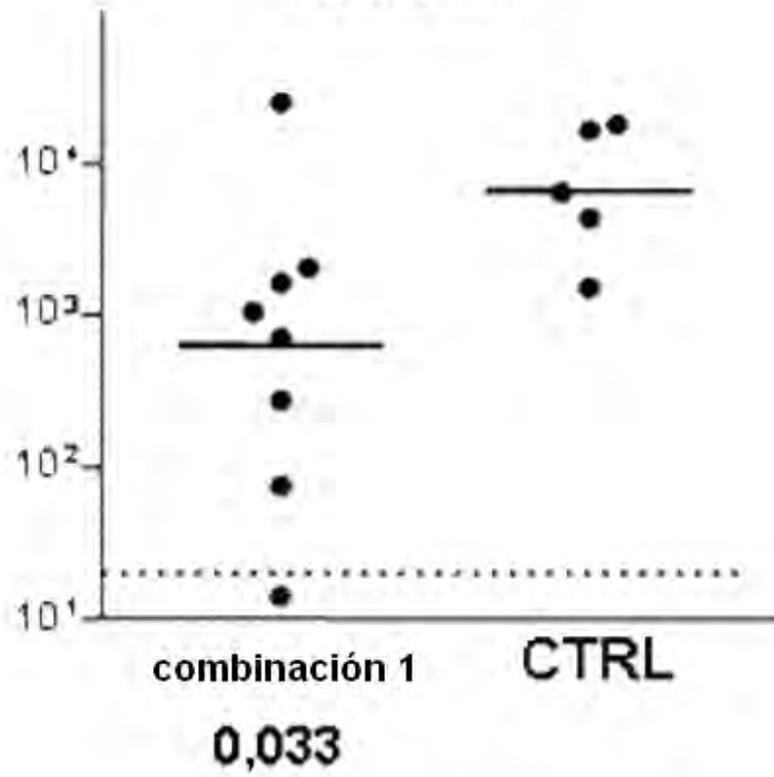


FIGURA 22

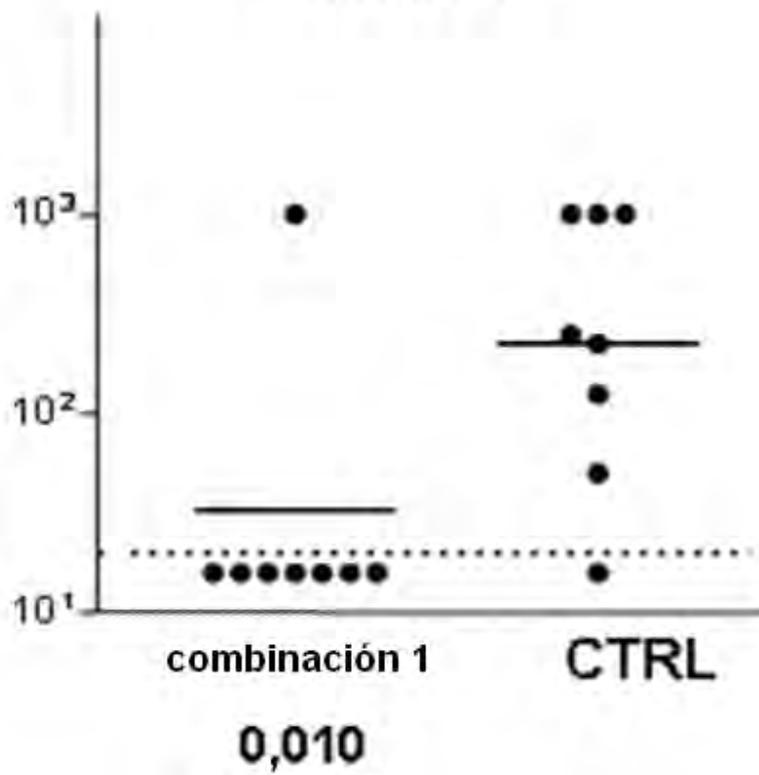
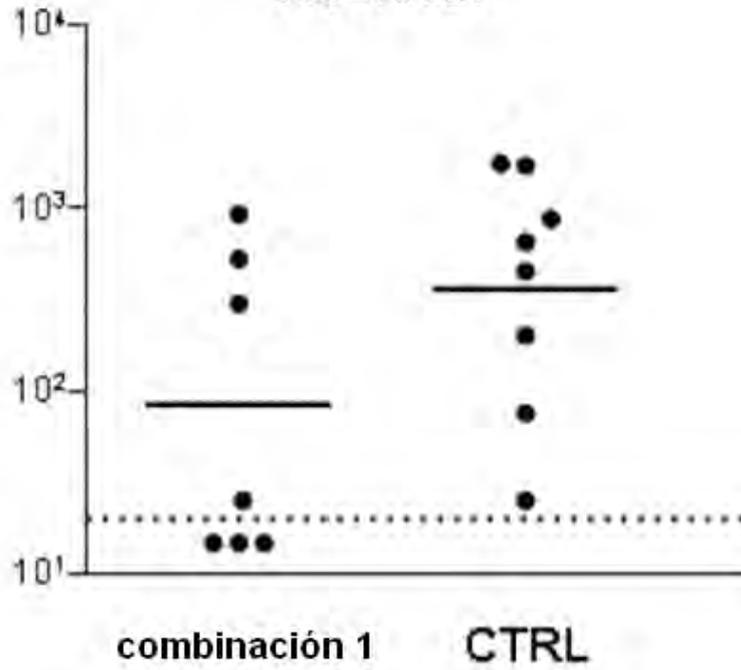
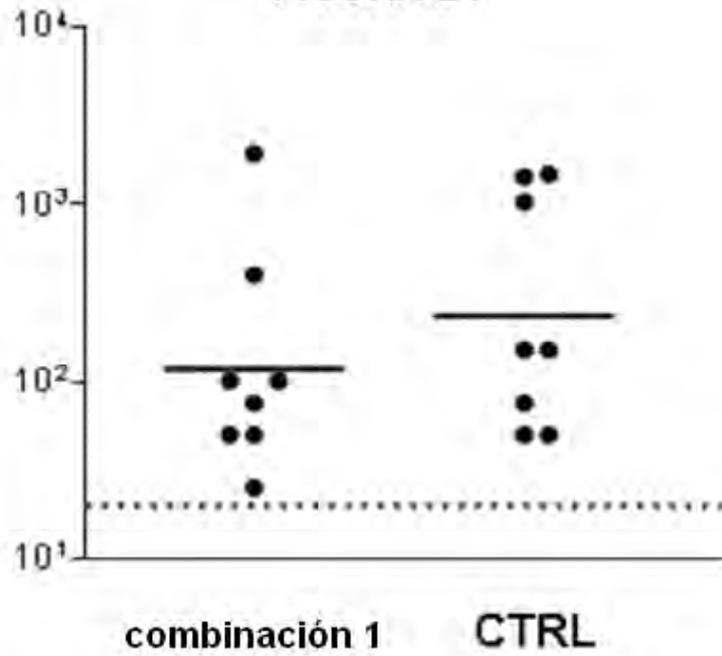


FIGURA 23



0,047

FIGURA 24



0,191

FIGURA 25

FIGURA 25A

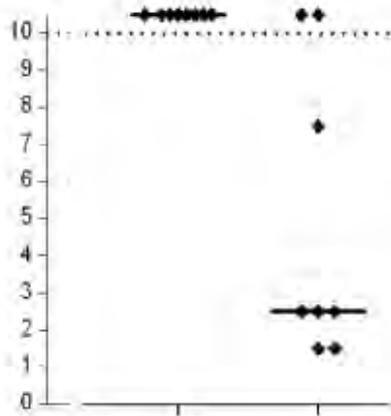


FIGURA 25B

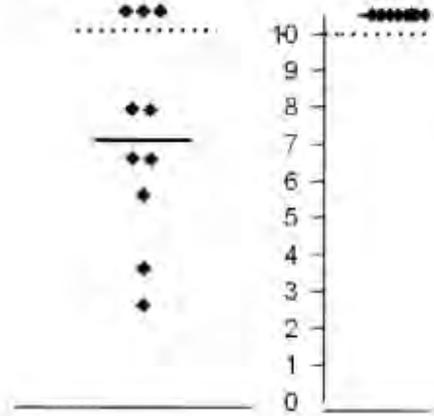


FIGURA 25C

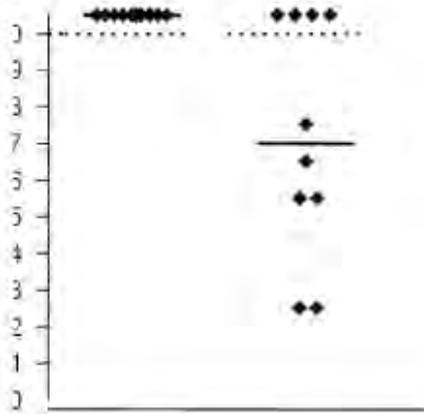


FIGURA 25D

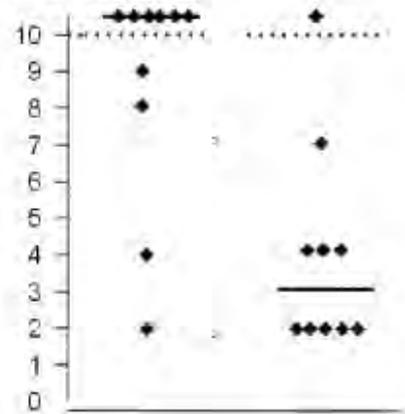


FIGURA 26

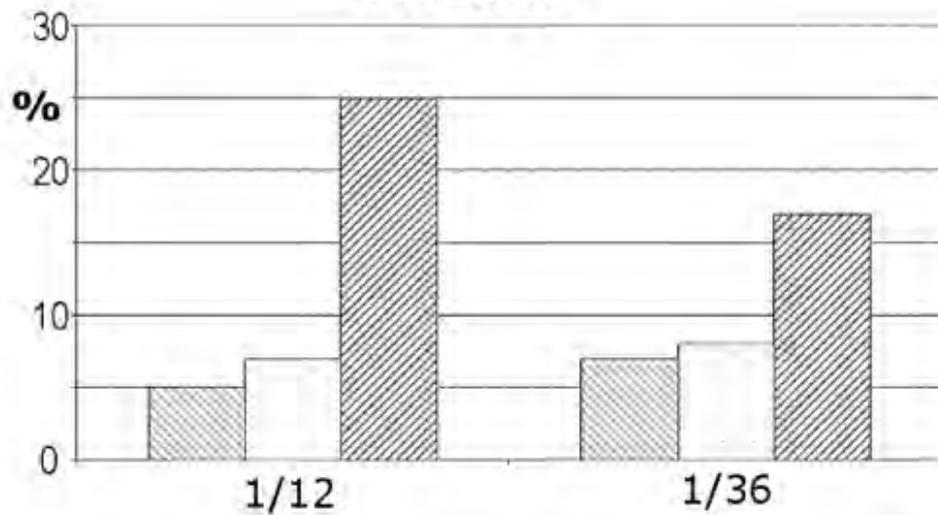


FIGURA 27

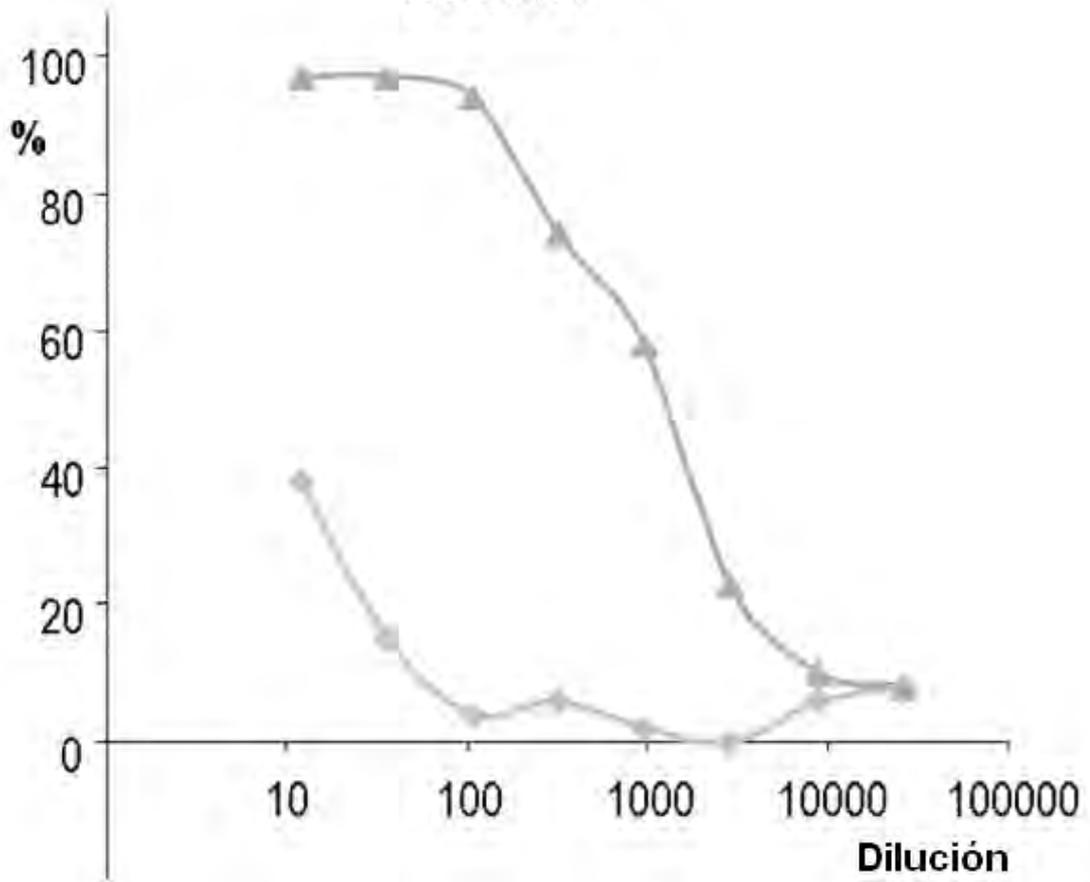


FIGURA 28

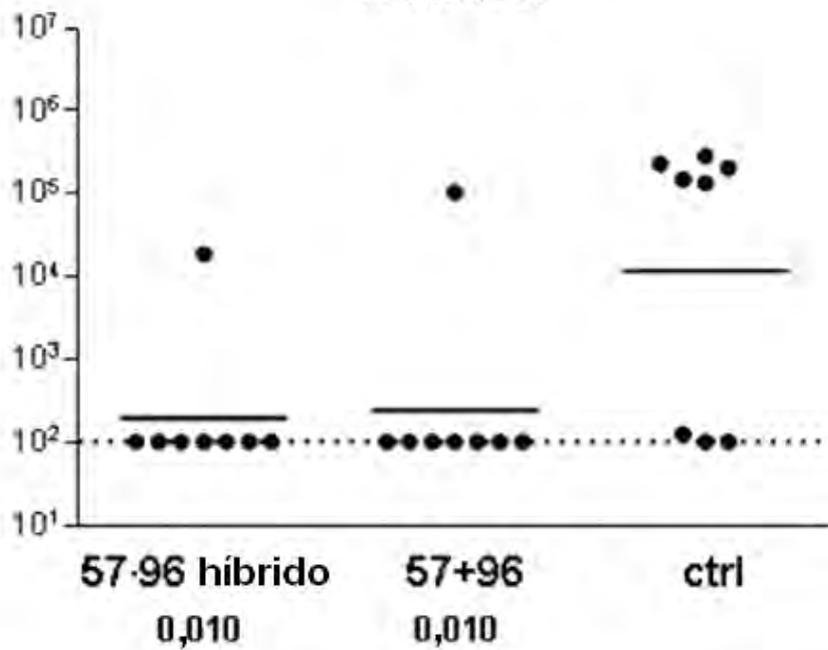


FIGURA 29

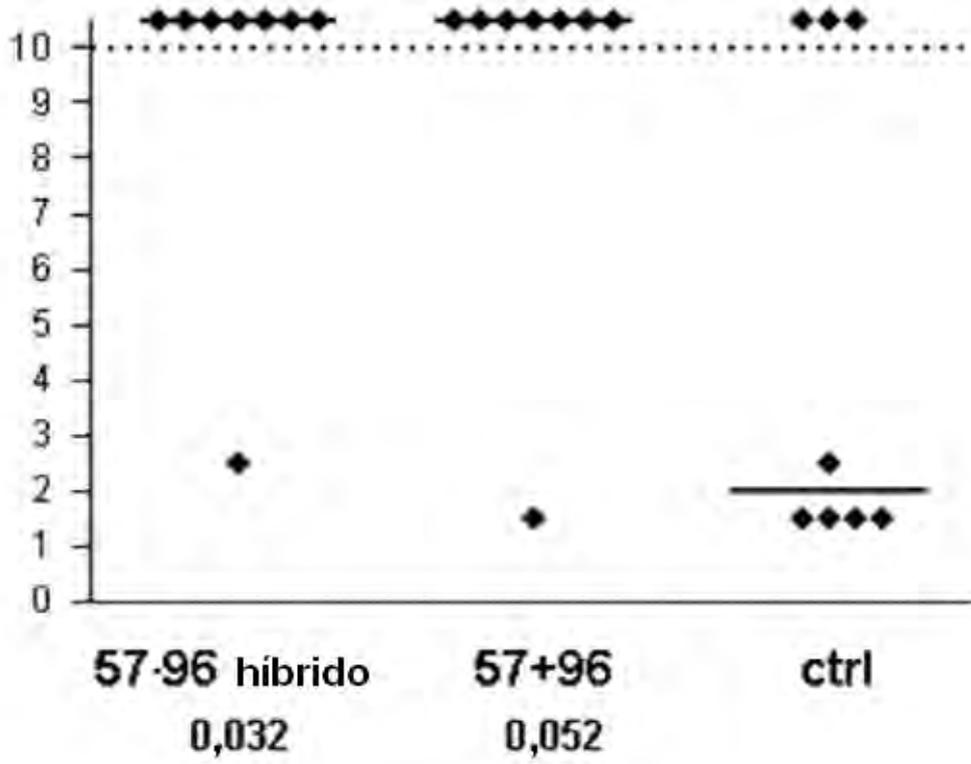


FIGURA 30

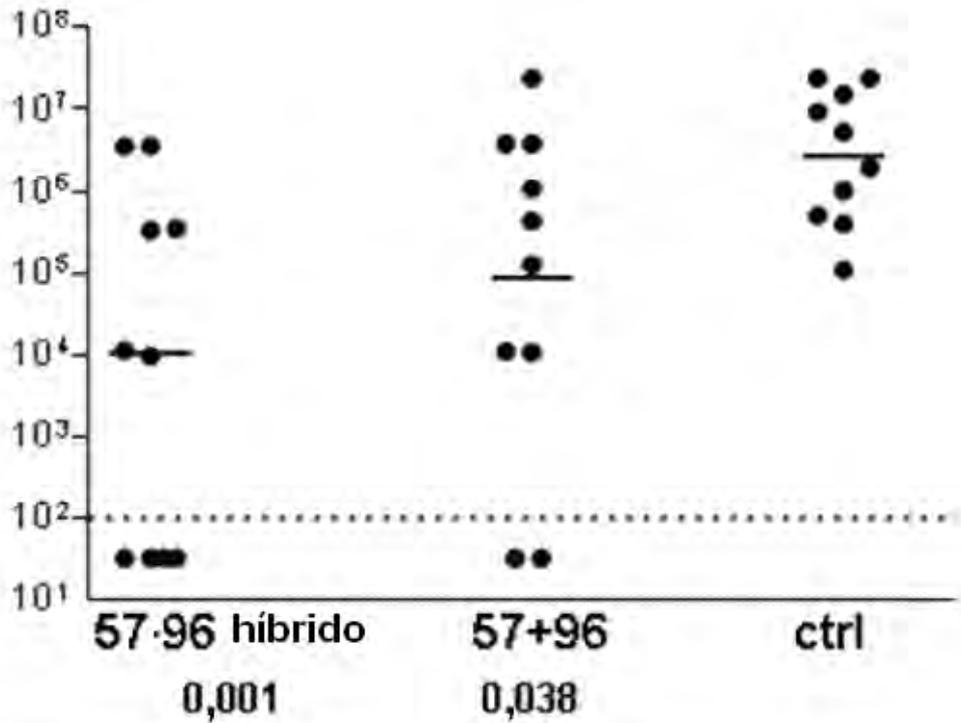


FIGURA 31

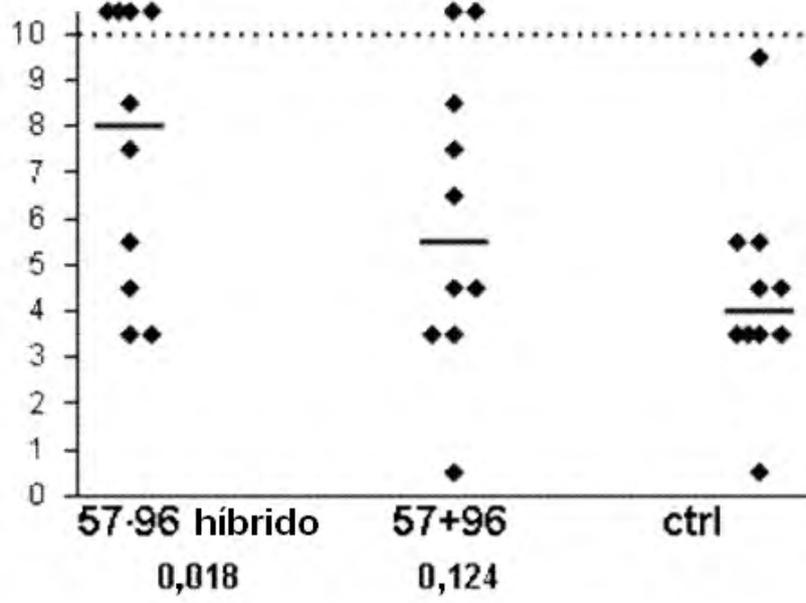


FIGURA 32

FIGURA 32A

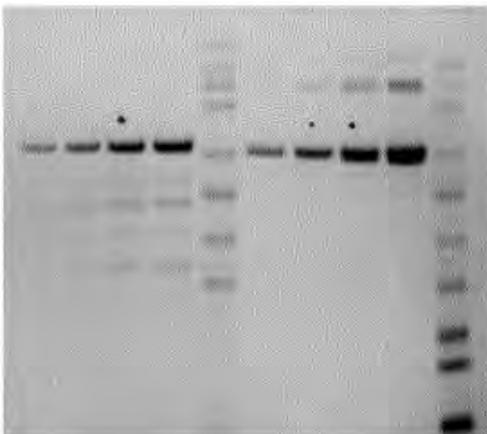


FIGURA 32B

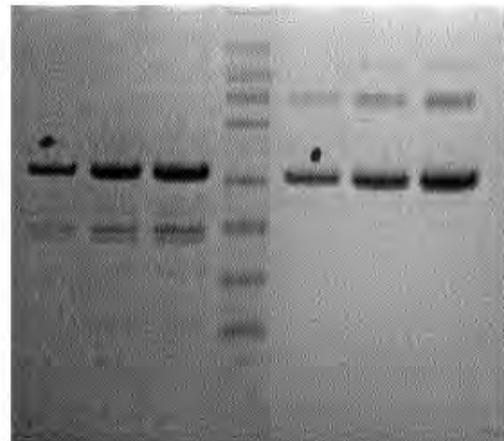


FIGURA 33

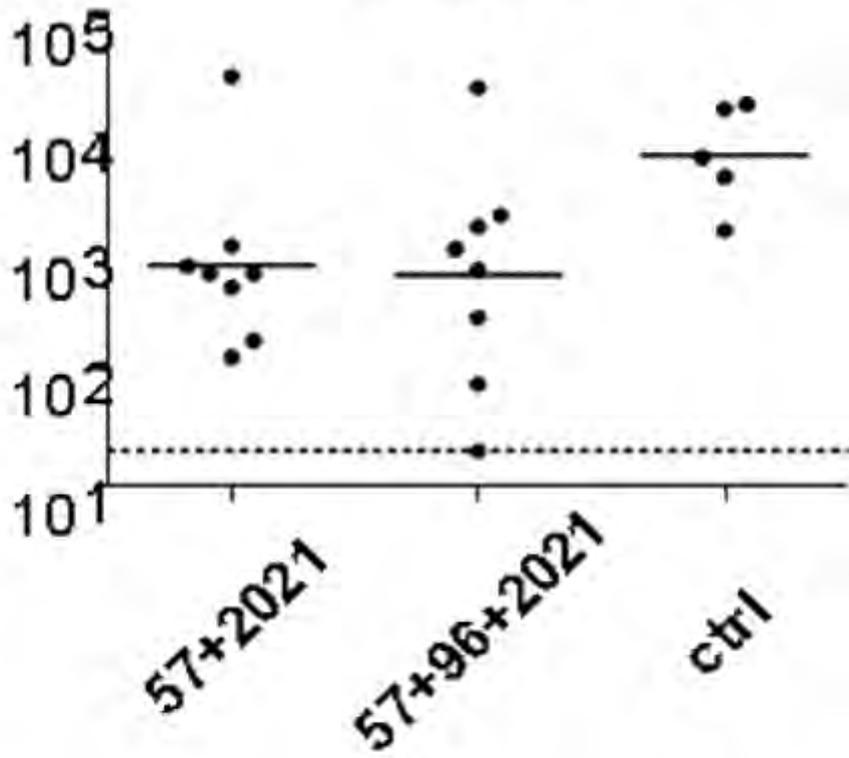


FIGURA 34

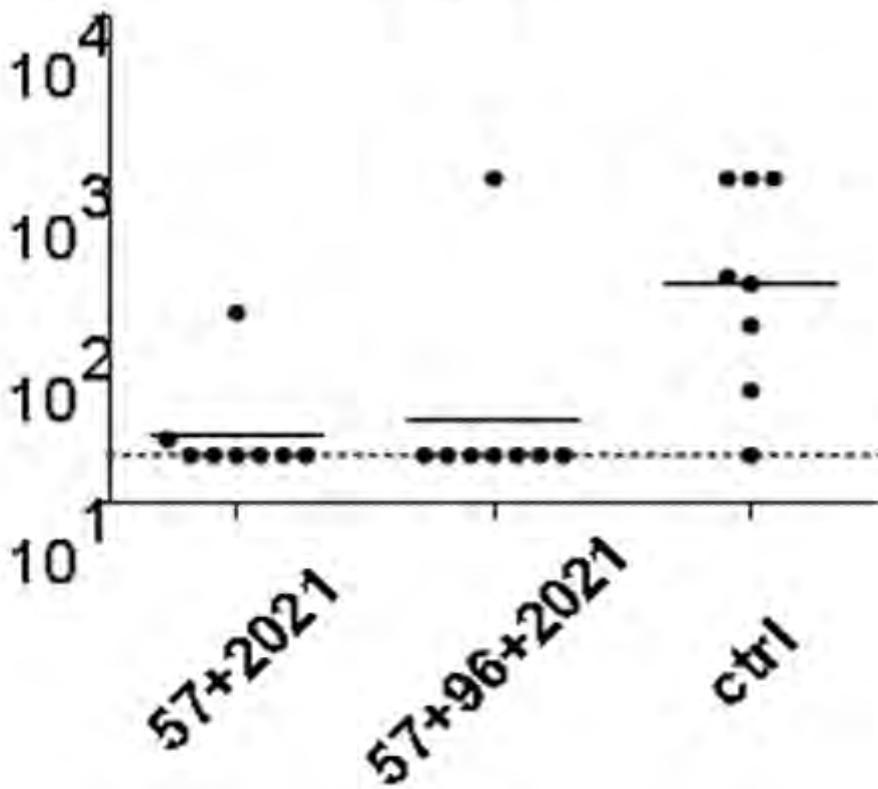


FIGURA 35

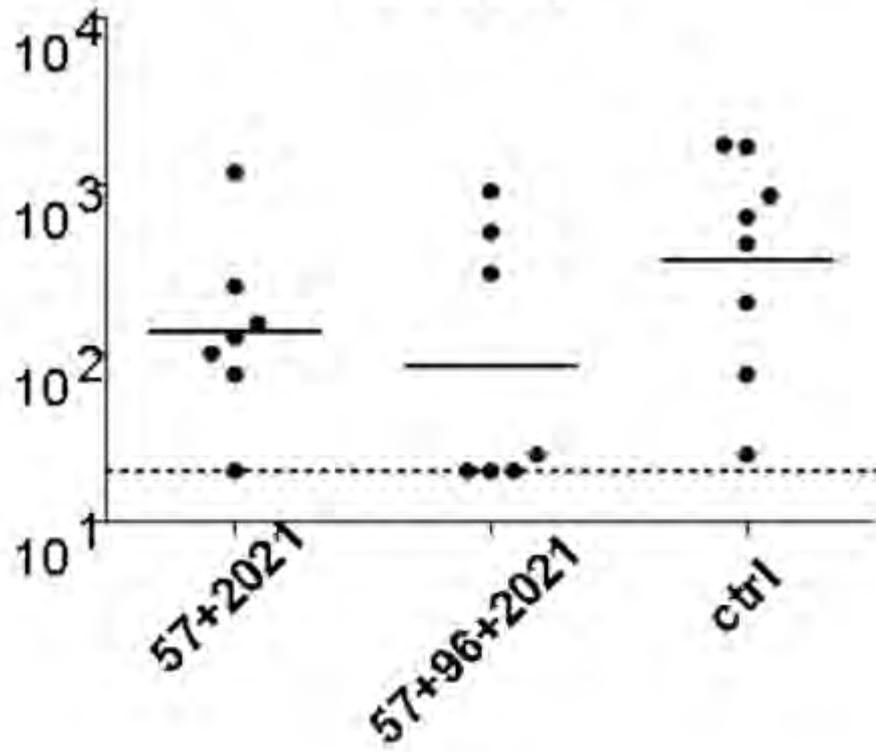


FIGURA 36

