



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 993 430**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/315** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2015** PCT/US2015/061859

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016** WO16081839

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2015** E 15861711 (8)

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2024** EP 3220937

⑮ Título: **Mutantes de neumolisina y métodos de uso de los mismos**

⑩ Prioridad:

**21.11.2014 US 201462082848 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**30.12.2024**

⑮ Titular/es:

**THE BOARD OF REGENTS OF THEUNIVERSITY OF OKLAHOMA (100.00%)  
660 Parrington Oval, Room 119  
Norman, OK 73019, US**

⑮ Inventor/es:

**TWETEN, RODNEY K.**

⑮ Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

Observaciones:

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

**ES 2 993 430 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

## Mutantes de neumolisina y métodos de uso de los mismos

- Las citolisinias dependientes del colesterol (CDC) son una gran familia de toxinas formadoras de poros que son producidas por más de 20 especies de los géneros *Clostridium*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus*, y *Arcanobacterium*. El mecanismo formador de poros de estas toxinas presenta dos características distintivas: una dependencia absoluta de la presencia de colesterol de membrana y la formación de un poro extraordinariamente grande. Cada CDC se produce como una proteína monomérica soluble que, con la excepción de un miembro, se secreta por un sistema de secreción de tipo II. Al encontrar una célula eucariota, las CDC experimentan una transformación de una proteína monomérica soluble a un complejo de poros supramolecular incluido en la membrana.
- La conversión de los monómeros en un complejo oligomérico de poros insertado en la membrana requiere algunos cambios extraordinarios en la estructura del monómero.
- Aunque las CDC son bien conocidas como proteínas beta-hemolíticas, se ha hecho cada vez más evidente que los patógenos bacterianos usan estas proteínas de maneras mucho más sofisticadas que como hemolisinas simples o agentes líticos celulares generales. La estructura de las CDC también muestra una plasticidad que ha permitido la evolución de características únicas para algunas CDC, sin comprometer el mecanismo fundamental de formación de poros. Algunas de estas características se reflejan en las CDC que activan el complemento, que utilizan un receptor no de esterol, que presenta un mecanismo formador de poros sensible al pH, o que pueden funcionar como un canal de translocación de proteínas.
- Las CDC son proteínas de cuatro dominios ricas en láminas  $\beta$ . Un undecapéptido rico en triptófano altamente conservado está presente en el dominio 4, que participa en la unión de algunas CDC a membranas ricas en colesterol. Además, se ha mostrado que otros tres bucles hidrófobos cortos (bucle L1, L2 y L3) yuxtapuestos al undecapéptido en la punta del dominio 4 también se insertan en la superficie de la membrana y anclan la CDC a la membrana en una orientación perpendicular. Después de la unión a la membrana, los monómeros de CDC se difunden lateralmente para iniciar la formación del oligómero de membrana.
- Una vez que el complejo de preporo alcanza un tamaño grande, presumiblemente una estructura de anillo completa, realiza entonces la transición al complejo de poros. El poro transmembrana se forma cuando dos haces  $\alpha$ -helicoidales en el dominio 3 de cada monómero dentro del complejo preporo se convierten en dos horquillas  $\beta$  transmembrana anfipáticas extendidas (TMH). Tras la conversión del preporo en el poro, la altura de la estructura de preporo experimenta un colapso vertical de aproximadamente 40 Angstroms. El colapso de la estructura de preporo lleva las TMH del dominio 3 dentro de una distancia sorprendente de la superficie de la membrana, punto en donde sufren una inserción concertada en la membrana que da como resultado la formación del poro de barril  $\beta$  transmembrana grande. El poro CDC es grande: está compuesto de 35 a 50 monómeros y presenta un diámetro de 250 a 300 Angstroms.
- Durante el proceso de interacción del monómero de CDC con la membrana, el undecapéptido y los otros tres bucles cortos (L1, L2 y L3) en la punta del dominio 4 se insertan en sándwich  $\beta$  en la membrana tras la interacción de los monómeros de CDC con la superficie de la membrana. Estos bucles no penetran profundamente en la membrana y aparentemente no participan directamente en la estructura del poro transmembrana. Una función de los bucles parece ser anclar los monómeros a la membrana en una posición vertical. El dominio 4 existe en una orientación perpendicular a la membrana y está rodeado por el medio acuoso, incluso en el estado oligomérico.
- El dominio 4 de las CDC media en el reconocimiento de membrana, ya sea a través del colesterol u otro receptor, como en el caso de ILY (Intermedilisina).
- Las CDC también son capaces de la lisis de una amplia variedad de tipos de células nucleadas *in vitro*, y esta capacidad ha sido a su vez utilizada por muchos investigadores para permeabilizar diversos tipos de células eucariotas con CDC. A pesar de la capacidad de estas toxinas para funcionar como agentes líticos celulares generales *in vitro*, todavía no se ha demostrado que la lisis celular sea una función primaria de las CDC durante una infección. La contribución de las CDC a la infección ha sido estudiada, por ejemplo, en *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Arcanobacterium pyogenes*, y *Clostridium perfringens*. Los resultados de algunos de estos estudios sugieren que las bacterias usan las CDC de maneras más sofisticadas que como agentes citolíticos generales. También parece que la estructura de las CDC ha sufrido algunas transformaciones evolutivas únicas que facilitan el mecanismo patógeno de estas especies bacterianas.
- Streptococcus pneumoniae* es un agente importante de la enfermedad en los seres humanos, especialmente entre bebés, ancianos, personas con enfermedad crónica y personas inmunocomprometidas. Es una bacteria aislada frecuentemente de pacientes con enfermedades invasivas tales como bacteriemia/septicemia, neumonía y meningitis con alta morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Incluso con una terapia antibiótica apropiada, las infecciones neumocócicas todavía dan como resultado muchas muertes. Aunque la aparición de fármacos antimicrobianos ha reducido la mortalidad global por enfermedad neumocócica, la presencia de cepas neumocócicas resistentes se ha convertido en un problema importante en el mundo hoy en día y subraya la necesidad de tratar y prevenir la infección neumocócica mediante métodos además de antimicrobianos. Las vacunas neumocócicas eficaces podrían tener un impacto importante en la morbilidad y mortalidad asociadas con la enfermedad por *S. pneumoniae*. Dichas vacunas

también serían potencialmente útiles para prevenir la otitis media en bebés y niños pequeños. Se necesitan claramente nuevas vacunas neumocócicas inmunogénicas que proporcionen inmunidad a largo plazo, especialmente para niños de menos de 2 años de edad, porque la incidencia de la enfermedad es alta y las respuestas de anticuerpos a los antígenos de vacunas de polisacáridos son pobres en este grupo de edad.

5 Cada año en los Estados Unidos, la enfermedad neumocócica representa una estimación de 3.000 casos de meningitis, 50.000 casos de bacteriemia, 500.000 casos de neumonía y 7 millones de casos de otitis media.

Las infecciones neumocócicas graves resultan de la diseminación de bacterias al torrente sanguíneo y al sistema nervioso central. En 1997, los datos de estudios basados en comunidad indicaron que la incidencia anual global de bacteriemia neumocócica en los Estados Unidos fue una estimación de 15-30 casos por 100.000; la tasa fue mayor para personas mayores de o con 65 años de edad (50-83 casos por 100.000) y para niños menores de o con 2 años de edad (160 casos por 100.000). En adultos, el 60 %-87 % de bacteriemia neumocócica estaba asociado con neumonía; en niños pequeños, los sitios primarios de infección frecuentemente no se identificaron.

10 En los Estados Unidos, el riesgo de adquirir bacteriemia es menor entre las personas blancas que entre las personas en otros grupos raciales/étnicos (es decir, negros, Nativos de Alaska e Indios Americanos). Los adultos negros tienen una incidencia global de bacteriemia de tres veces a cinco veces mayor (49-58 casos por 100.000) que los blancos. Las tasas de enfermedad neumocócica invasiva son excepcionalmente altas entre los Nativos de Alaska y niños Nativos de Alaska de menos de 2 años se determinó mediante un estudio de vigilancia prospectivo que era de 74 casos y 624 casos por 100.000, respectivamente. Las tasas para meningitis y neumonía bacteriémica son ocho veces a diez veces mayores para Nativos de Alaska de todas las edades que para otros grupos de población de EE. UU. Las tasas de incidencia más altas para cualquier población de EE. UU. se han informado entre grupos específicos de Indios Americanos (por ejemplo, Apaches). La incidencia anual global para tales grupos es 156 casos por 100.000; la incidencia para niños de 1-2 años de edad en estos grupos es de 2.396 casos por 100.000.

15 En los Estados Unidos, la incidencia anual global estimada de meningitis neumocócica es de uno a dos casos por 100.000. La incidencia de meningitis neumocócica es mayor entre niños de 6-24 meses de edad y personas de más de o igual a 65 años de edad. Las tasas para negros son dos veces más altas que las de blancos e hispanos. Debido a que la incidencia de meningitis por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) en niños disminuyó rápidamente después de la introducción de vacunas conjugadas con Hib, *S. pneumoniae* se ha convertido en la causa más común de la meningitis bacteriana en los Estados Unidos (26).

20 25 30 35 40 Cepas de *S. pneumoniae* resistentes a fármacos (DRSP) se han hecho cada vez más comunes en los Estados Unidos y en otras partes del mundo. En algunas áreas, se ha informado que hasta el 35 % de los aislados neumocócicos tienen una resistencia a la penicilina de nivel intermedio (concentración inhibidora mínima {MIC} igual a 0,1-1,0 µg/ml) o nivel alto (MIC mayor de o igual a 2 µg/ml). Muchos neumocos resistentes a penicilina también son resistentes a otros fármacos antimicrobianos (por ejemplo, eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol y cefalosporinas de espectro extendido). La resistencia a penicilina y resistencia a múltiples fármacos de alto nivel complican a menudo la gestión de la infección neumocócica y hacen cada vez más difícil la elección de la terapia antimicrobiana empírica para casos sospechosos de meningitis, neumonía y otitis media. El tratamiento de pacientes infectados con organismos no sensibles puede requerir el uso de agentes antimicrobianos alternativos caros y puede dar como resultado una hospitalización prolongada y costes médicos aumentados. El impacto de la resistencia antimicrobiana sobre la mortalidad no está claramente definido. La aparición de resistencia antimicrobiana enfatiza adicionalmente la necesidad de prevenir infecciones neumocócicas por vacunación.

45 50 55 60 Las vacunas neumocócicas disponibles actualmente, PNEUMOVAX®23 (Merck & Co., Inc., Kenilworth, N.J.) y PNU-IMMUNE®23 (Lederle-Praxis Biologicals, Pearl River, NY), incluyen 23 antígenos polisacáridos capsulares purificados de *S. pneumoniae* (serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F). Estas vacunas se autorizaron en los Estados Unidos en 1983 y reemplazaron una formulación 14-valente anterior que se autorizó en 1977. Una dosis (0,5 ml) de la vacuna 23-valente contiene 25 µg de cada antígeno polisacárido capsular disuelto en solución salina isotónica con fenol (0,25 %) o timerosal (0,01 %) añadidos como conservante y sin adyuvante. A partir de 1997, los 23 tipos capsulares en la vacuna representaron al menos el 85 %-90 % de los serotipos que causan infecciones neumocócicas invasivas entre niños y adultos en los Estados Unidos. Los seis serotipos (6B, 9V, 14, 19A, 19F y 23F) que causaron con mayor frecuencia infección neumocócica invasiva resistente a fármacos en los Estados Unidos a partir de 1997 están representados en la vacuna 23-valente. Como se indica más adelante, la conveniencia de una vacuna compuesta únicamente de polisacáridos capsulares es limitada.

La neumolisina, en particular, es un componente clave en la patogénesis de la neumonía estreptocócica, que mata a más de un millón de seres humanos al año en todo el mundo. El uso de neumolisina como parte de una vacuna para las infecciones pulmonares por *Streptococcus pneumoniae* y la otitis media podría proporcionar beneficios importantes, ya que las vacunas basadas en el polisacárido capsular están perdiendo eficacia debido a la variación genética y son difíciles de generar, ya que hay más de 90 serotipos capsulares diferentes de *Streptococcus pneumoniae*. La inmunidad frente a un tipo capsular no protege frente a otro tipo capsular. La vacuna neumocócica actualmente disponible analizada anteriormente, que comprende 23 polisacáridos capsulares de las cepas que más frecuentemente causan enfermedad, tiene deficiencias significativas relacionadas principalmente con la escasa

inmunogenicidad de algunos polisacáridos capsulares, la diversidad de los serotipos y las diferencias en la distribución de serotipos a lo largo del tiempo, áreas geográficas y grupos de edad. Actualmente, se ha usado una variante de mutación puntual de neumolisina para el desarrollo de vacunas. Este mutante de neumolisina (denominado "Pd-B") contiene una única mutación en la posición 433 (en donde el residuo de triptófano nativo se ha cambiado a una fenilalanina). Esta mutación en la neumolisina está en el undecapéptido conservado del Dominio 4, la estructura dentro de las citolisinias dependientes del colesterol (CDC) que se había pensado durante mucho tiempo que mediaba en la unión a membranas de mamíferos.

Aunque el mutante Pd-B de neumolisina se usa convencionalmente para el desarrollo de vacunas, esta proteína todavía puede experimentar una variedad de transiciones estructurales que se producen después de la unión a la membrana de las células de mamíferos. Estos cambios alteran drásticamente su estructura y pueden disminuir su capacidad para estimular una respuesta inmunitaria neutralizante eficaz en un paciente, principalmente porque la estructura de la neumolisina que el sistema inmunitario del paciente puede "ver" será la del complejo oligomérico unido a la célula terminal en lugar de la estructura inicial de la neumolisina monomérica soluble. Más importante aún, la neumolisina convertida genéticamente en toxoide actual está aún dificultada por un nivel inaceptable de toxicidad. La base para esta toxicidad no está todavía clara, pero probablemente resulta del hecho de que este toxoide todavía puede unirse a y oligomerizarse en células de mamíferos. US 8 128 939 divulga polipéptidos de neumolisina mutantes.

Por lo tanto, los mutantes de citolisinias dependientes de colesterol, tales como (pero sin limitarse a) neumolisina, que tienen toxicidad reducida y actividad hemolítica reducida, pero que todavía estimulan una respuesta inmunitaria contra organismos patológicos correspondientes, serían de gran beneficio.

Los dibujos adjuntos no pretenden limitar el alcance de la invención. Las figuras no están necesariamente a escala, y ciertas características y ciertas vistas de las figuras pueden mostrarse exageradas respecto a la escala o en esquemas en interés de la claridad y la concisión.

Las Figuras 1A-E contienen una comparación de alineamiento de aminoácidos de secuencias de aminoácidos nativos de diversas citolisinias dependientes del colesterol. Las secuencias de aminoácidos de cada proteína identificada en la presente memoria corresponden a las SEQ ID NO en la Tabla 1 en la presente memoria; por ejemplo, la cereolisina en la Fig. 1A-E corresponde en la SEQ ID NO: 2 en la Tabla 1, y la SEQ ID NO: 18 (PAF) en la Tabla 1 corresponde a la viridanolisina en la Fig. 1A-E.

La Figura 2 muestra la estructura cristalina de ILY (Intermedilisina) y una comparación de las estructuras cristalinas D4 de ILY y PFO (Perfringolisina). En (a) se muestra una representación en cinta de la estructura cristalina de ILY<sup>25</sup> denotando las posiciones de diversas estructuras y residuos a los que se hace referencia en estos estudios. En (b) se muestra una superposición de una representación en cinta de las estructuras D4 de ILY y PFO basándose en las estructuras cristalinas de ambas proteínas<sup>23, 24</sup>. Se muestran las localizaciones relativas del undecapéptido tanto para las proteínas como para los residuos de los bucles L1-L3 de ILY y PFO (el último entre paréntesis). Las imágenes estructurales se generaron usando VMD<sup>25</sup>.

La Figura 3 ilustra que el undecapéptido ILY se inserta en membranas deplecionadas de colesterol. El residuo de ILY Ala-486 se mutó a una cisteína (ILY<sup>A486C</sup>) y se derivatizó con NBD (yodoacetamido-N,N'-dimetil-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazolil)etilen-diamina). La emisión de fluorescencia del NBD se determinó cuando ILY<sup>A486C-NBD</sup> se incubó solo (línea continua), con glóbulos rojos humanos (hRBC-línea discontinua), o con hRBC deplecionados de colesterol (línea de puntos).

La Figura 4 ilustra que los bucles L1, L2 y L3 de ILY no se insertan en membranas deplecionadas de colesterol. Cada residuo del bucle D4 conocido por insertarse en la membrana se sustituyó por una cisteína y se modificó con NBD. ILY<sup>A428C-NBD</sup> (a), ILY<sup>A464C-NBD</sup> (b) o ILY<sup>L518C-NBD</sup> (c) se incubó solo (línea continua), con hRBC (línea discontinua) o con hRBC deplecionados de colesterol (línea discontinua). A continuación, se restauró el colesterol de la membrana y se determinó la inserción de los bucles L1, L2 y L3. ILY<sup>A428C-NBD</sup> (d), ILY<sup>A464C-NBD</sup> (e) o ILY<sup>L518C-NBD</sup> (f) se incubó solo (línea continua) o con membranas repletas de colesterol (línea discontinua).

La Figura 5 muestra que los bucles L1-L3 median la unión de PFO a liposomas ricos en colesterol, (a) análisis de SPR de la unión de PFO nativo (línea continua) y modificado con NEM (línea discontinua), (b) análisis de SPR de la unión de PFO nativo (línea continua), PFO<sup>A401D</sup> (línea discontinua larga), PFO<sup>A437D</sup> (línea discontinua corta) y PFO<sup>L491D</sup> (línea de puntos).

La Figura 6 ilustra que la modificación química del sulfhidrilo de cisteína del undecapéptido PFO bloquea la inserción en la membrana de los triptófanos del undecapéptido y la conversión del preporo en poro. El aumento en la emisión de fluorescencia intrínseca de los triptófanos del undecapéptido PFO se ha usado para medir su inserción en la membrana<sup>20, 21</sup>. (a) El aumento en la emisión de fluorescencia intrínseca de los triptófanos en PFO nativo se muestra a medida que se mueve desde su forma soluble (línea continua) a su estado unido a la membrana (línea discontinua). (b) El mismo experimento mostrado en (a) se repitió con PFO nativo que se había modificado en Cys-459 con NEM.

La Figura 7 muestra la respuesta inmunogénica en ratones inmunizados con un polipéptido de neumolisina mutante y una neumolisina de tipo salvaje inoculados después con *S. pneumoniae*.

A menos que se defina lo contrario en la presente memoria, los términos científicos y técnicos tendrán los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, y química e hibridación de proteínas y oligo o polinucleótidos descritas en la presente memoria son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Se usan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofeción). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Green y Sambrook (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012)) y Coligan et al. (Current Protocols in Immunology, Current Protocols, Wiley Interscience (1994)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en la presente memoria son las bien conocidas y comúnmente usadas en la técnica. Se usan técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento o diagnóstico *in vivo* se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia o para diagnóstico *in vivo*.

Todas las patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones no de patente mencionadas en la presente memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de los expertos en la técnica.

Se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:

El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas solamente o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación soporta una definición que se refiere a alternativas solamente e "y/o". A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se está empleando para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos del estudio. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, cuando se utiliza el término "aproximadamente", el valor designado puede variar más o menos en un doce por ciento, u once por ciento, o diez por ciento, o nueve por ciento, u ocho por ciento, o siete por ciento, o seis por ciento, o cinco por ciento, o cuatro por ciento, o tres por ciento, o dos por ciento, o uno por ciento. Se entenderá que el uso del término "al menos uno" incluye uno, así como cualquier cantidad más de uno, incluyendo, pero sin limitarse a, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, etc. El término "al menos uno" puede extenderse hasta 100 o 1.000 o más, dependiendo del término al que esté unido; además, las cantidades de 100/1.000 no deben considerarse limitantes, ya que los límites superiores también pueden producir resultados satisfactorios. Además, se entenderá que el uso del término "al menos uno de X, Y y Z" incluye X solo, Y solo y Z solo, así como cualquier combinación de X, Y y Z. El uso de terminología de números ordinales (es decir, "primero", "segundo", "tercero", "cuarto", etc.) es únicamente con el propósito de diferenciar entre dos o más elementos y no pretende implicar ninguna secuencia u orden o importancia a un elemento sobre otro o cualquier orden de adición, por ejemplo.

Como se usa en esta memoria descriptiva y reivindicación(es), las palabras "que comprende" (y cualquier forma de que comprende, tal como "comprenden" y "comprende"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de que incluye, tal como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de que contiene, tal como "contiene" y "contienen") son inclusivos o abiertos y no excluyen elementos o etapas de método adicionales, no citados.

El término "o combinaciones de los mismos", como se usa en la presente memoria, se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C, o combinaciones de los mismos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AAB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, y así sucesivamente. El experto en la técnica entenderá que típicamente no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que sea evidente de otro modo a partir del contexto.

A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que los términos "sustancialmente" y "aproximadamente" no se limitan a los términos específicos cualificados por estos adjetivos/adverbios, sino que se entenderá que indican un valor que incluye la variación inherente de error para el dispositivo, empleándose el método para determinar el valor y/o la variación que existe entre sujetos de estudio. Por lo tanto, dichos términos permiten pequeñas variaciones y/o desviaciones que no dan como resultado un impacto significativo en los mismos. Por ejemplo, en ciertos casos, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un

valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se está empleando para determinar el valor y/o la variación que existe entre los sujetos del estudio. De manera similar, el término "sustancialmente" también puede referirse al 80 % o superior, tal como el 85 % o superior, o el 90 % o superior, o el 95 % o superior, o el 99 % o superior, y similares.

- 5 Los términos "proteína purificada" o "proteína aislada" como se usan en la presente memoria significan que la proteína o fragmento está suficientemente libre de contaminantes o componentes celulares con los que la proteína normalmente existe, para distinguir la proteína de los contaminantes o componentes celulares. No se contempla que "purificada" necesite tener una preparación que sea técnicamente totalmente pura (homogénea), sino que purificada como se usa en la presente memoria significa que la proteína o fragmento polipeptídico está suficientemente separado de los contaminantes o componentes celulares con los que normalmente existe, para proporcionar la proteína en un estado en el que puede usarse en un ensayo, tal como inmunoprecipitación o ELISA. Por ejemplo, la proteína purificada puede estar en un gel electroforético.

10 El término "mutante", cuando se usa en la presente memoria para describir un polipéptido, se refiere a un polipéptido que es menos del 100 % idéntico a una secuencia de aminoácidos del polipéptido de tipo silvestre (nativo) correspondiente, y en particular a un polipéptido sintético o recombinante en donde se han sustituido una o más 15 posiciones de residuos de aminoácidos del polipéptido de tipo silvestre. El término "variante" puede usarse indistintamente con el término "mutante".

20 Las CDC mutantes descritas en la presente memoria pueden combinarse con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, incluyendo portadores, vehículos y diluyentes, para formar composiciones inmunogénicas. La expresión excipiente farmacéuticamente aceptable pretende referirse a disolventes u otros materiales en donde las CDC mutantes (por ejemplo, polipéptidos de neumolisin mutantes) pueden disponerse para mejorar la solubilidad, la capacidad de suministro, la dispersión, la estabilidad y/o la integridad conformacional. Los 25 ejemplos de tales excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas (tales como soluciones salinas fisiológicas y soluciones salinas tamponadas a pH neutro tales como solución salina tamponada con fosfato (PBS)), etanol, azúcares, dextrosa, glicerol y/o polialcoholes (tales como manitol y sorbitol). Otros tipos de vehículos incluyen liposomas o polímeros y similares.

30 El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, es decir, el material puede administrarse a un individuo junto con el compuesto seleccionado sin provocar ningún efecto biológico indeseable o interactuar de una manera indeseable con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en donde está contenido.

35 Las CDC mutantes o las composiciones inmunogénicas que contienen dichas CDC mutantes pueden combinarse además con un adyuvante tal como (pero sin limitarse a) adyuvante incompleto de Freund, adyuvante completo de Freund, alumbre, monofosforil lípido A, fosfato o hidróxido de alumbre, QS-21, sales, es decir, AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, AlNa(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, AlNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; sílice, caolín y/o polinucleótidos de carbono (es decir, poli IC y poli AU). Los ejemplos no limitantes de 40 adyuvantes incluyen QuilA, Alhydrogel y similares. El término "adyuvante" se refiere a una sustancia que es capaz de potenciar, acelerar o prolongar una respuesta inmunitaria cuando se da con el inmunógeno de la composición. Opcionalmente, las CDC mutantes pueden combinarse con inmunomoduladores e inmunoestimulantes, tales como, pero sin limitarse a, interleucinas, interferones y similares. Los expertos en la técnica conocen muchas vacunas y otras formulaciones farmacéuticas.

45 Por "biológicamente activo" se quiere decir la capacidad de modificar el sistema fisiológico de un organismo. Una molécula puede ser biológicamente activa a través de sus propias funcionalidades, o puede ser biológicamente activa basándose en su capacidad para activar o inhibir moléculas que tienen su propia actividad biológica.

50 El término "inmunogénico" cuando se usa en la presente memoria pretende referirse a la capacidad de una sustancia para incitar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, una "composición inmunogénica" es una composición que comprende una CDC mutante, tal como un polipéptido de neumolisin mutante, que puede incitar una respuesta inmunitaria en un animal sujeto, tal como la producción de anticuerpos, cuando se administra al mismo. El término "vacuna" se refiere a una composición inmunogénica para la administración a un sujeto para incitar una respuesta inmunitaria contra un antígeno particular. Por ejemplo, una vacuna que comprende uno o más de los polipéptidos de neumolisin mutantes es una vacuna para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección causada por la bacteria *Streptococcus pneumoniae*.

55 El término "paciente" o "sujeto", como se usa en la presente memoria, incluye sujetos humanos y veterinarios. "Mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo (pero sin limitarse a) seres humanos, animales domésticos (tales como, pero sin limitarse a, perros y gatos), animales de granja (tales como, pero sin limitarse a, vacas, caballos, cerdos, cabras y ovejas), animales de laboratorio (tales como, pero sin limitarse a, ratones, ratas, conejos, cobayas y chinchillas), primates no humanos y cualquier otro animal que tenga tejido mamario.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan tratamiento incluyen, pero no se limitan a, individuos que ya tienen una afección o trastorno particular, así

como individuos que están en riesgo de adquirir una afección o trastorno particular (por ejemplo, los que necesitan medidas profilácticas/preventivas). El término "tratar" se refiere a administrar un agente a un paciente con fines terapéuticos y/o profilácticos/preventivos.

5 Una "composición terapéutica" o "composición farmacéutica" se refiere a un agente que puede administrarse *in vivo* para provocar un efecto terapéutico y/o profiláctico/preventivo.

10 La expresión "administrar una cantidad terapéuticamente eficaz" o "administrar una cantidad profilácticamente eficaz" pretende proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento, reducción en la aparición, prevención o gestión de una enfermedad. La cantidad específica que es terapéuticamente eficaz puede ser determinada fácilmente por el médico normal, y puede variar dependiendo de factores conocidos en la técnica, tales como el tipo de enfermedad/cáncer, el historial y edad del paciente, el estadio de la enfermedad, y la coadministración de otros agentes.

15 Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el polipéptido. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

20 15 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una molécula o conjugado o derivado de la misma biológicamente activo suficiente para mostrar un efecto terapéutico deseado sin efectos secundarios adversos indebidos (tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica) en proporción con una relación beneficio/riesgo razonable cuando se usa de la manera de los conceptos de la invención. El efecto terapéutico puede incluir, por ejemplo, pero no a modo de limitación, inhibir el crecimiento de tejido no deseado o células malignas. La cantidad eficaz para un sujeto dependerá del tipo de sujeto, el tamaño y la salud del sujeto, la naturaleza y gravedad de la afección a tratar, el método de administración, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay), las formulaciones específicas empleadas y similares. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad efectiva exacta por adelantado. Sin embargo, la cantidad eficaz para una situación dada puede ser determinada por un experto en la técnica usando experimentación rutinaria basada en la información proporcionada en la presente memoria.

25 20 Como se usa en la presente memoria, el término "terapia concurrente" se usa indistintamente con los términos "terapia de combinación" y "terapia adyuvante", y se entenderá que significa que el paciente que necesita tratamiento se trata o se le administra otro fármaco para la enfermedad junto con las composiciones farmacéuticas. Esta terapia concurrente puede ser terapia secuencial, donde el paciente se trata primero con un fármaco y luego con el otro, o los dos fármacos se administran simultáneamente.

30 35 Los términos "administración" y "administrar", como se usan en la presente memoria, se entenderá que incluyen todas las vías de administración conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, las vías oral, tópica, transdérmica, parenteral, subcutánea, intranasal, mucosal, intramuscular, intraperitoneal, intravítreo e intravenosa, incluyendo aplicaciones tanto locales como sistémicas. Además, las composiciones (y/o los métodos de administración de las mismas) pueden diseñarse para proporcionar liberación retardada, controlada o sostenida usando técnicas de formulación que son bien conocidas en la técnica.

40 45 Los términos "sustitución", "inserción", "adición" y "delección" se usan en la presente memoria con referencia a secuencias de aminoácidos o nucleótidos. Una "sustitución" se refiere a un reemplazo de uno o más nucleótidos o aminoácidos por diferentes nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. Una "inserción" o "adición" es el cambio en una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que ha dado como resultado la adición de uno o más residuos de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente, en comparación con la secuencia natural. Una "delección" se define como un cambio en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos en donde están ausentes uno o más residuos de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente.

50 55 Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos individuales; las inserciones serán usualmente del orden de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, aunque pueden tolerarse inserciones considerablemente mayores. Las delecciones varían de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 residuos, aunque en algunos casos las delecciones pueden ser mucho mayores.

Pueden usarse sustituciones, delecciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para llegar a un polipéptido mutante final. Generalmente, se cambian unos pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula. Sin embargo, en ciertas circunstancias, pueden tolerarse cambios mayores.

50 Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como el reemplazo de una isoleucina por una valina, es decir, reemplazos conservativos de aminoácidos. Las inserciones o delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos.

55 Las sustituciones pueden realizarse según "sustituciones conservativas" conocidas. Una "sustitución conservativa" se refiere a la sustitución de un aminoácido en una clase por un aminoácido en la misma clase, donde una clase se define por las propiedades fisicoquímicas comunes de la cadena lateral de los aminoácidos y las altas frecuencias de sustitución en proteínas homólogas encontradas en la naturaleza.

Por el contrario, las sustituciones pueden ser no conservativas. Una "sustitución no conservativa" se refiere a la sustitución de un aminoácido en una clase con un aminoácido de otra clase.

El término "polipéptido", como se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto constituido por una cadena única de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. El término "proteína", como se usa en la presente memoria, puede ser sinónimo del término "polipéptido" o puede referirse, además, a un complejo de dos o más polipéptidos.

El término "molécula de ácido nucleico" incluye moléculas de ARN, ADN y ADNc. Se entenderá que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede producir una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican una proteína CDC mutante dada. Se incluye cada secuencia de nucleótidos variante posible, todas las cuales son posibles dada la degeneración del código genético.

Una construcción o secuencia de ácido nucleico "heteróloga" tiene una porción de la misma que no es nativa para la célula en donde se expresa. El término "heteróloga", con respecto a una secuencia de control, se refiere a una secuencia de control (es decir, promotor o potenciador) que no funciona en la naturaleza para regular el mismo gen cuya expresión está regulando actualmente. Generalmente, las secuencias de ácido nucleico heterólogas no son endógenas para la célula o no son parte del genoma en donde están presentes; más bien, las secuencias heterólogas se han añadido a la célula, tal como mediante infección, transfección, transformación, microinyección, electroporación o similares. Una construcción de ácido nucleico "heteróloga" puede contener una combinación de secuencia de control/secuencia codificante de ADN que es la misma que, o diferente de, una combinación de secuencia de control/secuencia codificante de ADN encontrada en la célula nativa.

Como se usa en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una construcción de ácido nucleico diseñada para la transferencia entre diferentes células huésped. Un "vector de expresión" se refiere a un vector que tiene la capacidad de incorporar y expresar fragmentos de ADN heterólogos en una célula extraña. Muchos vectores de expresión procariotas y eucariotas están disponibles comercialmente. La selección de vectores de expresión apropiados está dentro del conocimiento de los expertos en la técnica.

Por consiguiente, un "casete de expresión" o "vector de expresión" es una construcción de ácido nucleico generada recombinantemente o sintéticamente, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula diana. El casete de expresión recombinante puede incorporarse en un plásmido, cromosoma, ADN mitocondrial, ADN de plástido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, la porción de casete de expresión recombinante de un vector de expresión incluye, entre otras secuencias, una secuencia de ácido nucleico que se va a transcribir y un promotor.

Como se usa en la presente memoria, el término "plásmido" se refiere a una construcción de ADN bícatenario (ds) circular usada como vector de clonación, y que forma un elemento genético autorreplicante extracromosómico en muchas bacterias y algunos eucariotas.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "secuencia de nucleótidos que codifica un marcador seleccionable" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es capaz de expresarse en células y en donde la expresión del marcador seleccionable confiere a las células que contienen el gen expresado la capacidad de crecer en presencia de un agente selectivo correspondiente, o en condiciones de crecimiento selectivo correspondientes.

Como se usa en la presente memoria, el término "promotor" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que funciona para dirigir la transcripción de un gen en 3'. El promotor será generalmente apropiado para la célula huésped en donde se expresa el gen diana. El promotor, junto con otras secuencias de ácido nucleico reguladoras de la transcripción y traducción (también denominadas "secuencias de control"), es necesario para expresar un gen dado. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción incluyen, pero no se limitan a, secuencias promotoras, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y detención de la transcripción, secuencias de inicio y detención de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras.

Los términos "gen químérico" o "construcción de ácido nucleico heterólogo", como se utilizan en la presente memoria, se refieren a un gen no nativo (es decir, uno que se ha introducido en un huésped) que puede estar compuesto por partes de diferentes genes, incluyendo elementos reguladores. Una construcción génica químérica para la transformación de una célula huésped está compuesta típicamente por una región reguladora de la transcripción (promotor) unida operativamente a una secuencia codificante de proteína heteróloga, o, en un gen químérico de marcador seleccionable, a un gen de marcador seleccionable que codifica una proteína que confiere resistencia a antibiótico a las células transformadas. Un gen químérico típico para la transformación en una célula huésped incluye una región reguladora de la transcripción que es constitutiva o inducible, una secuencia codificante de proteína, y una secuencia terminadora. Una construcción génica químérica también puede incluir una segunda secuencia de ADN que codifica un péptido señal si se desea la secreción de la proteína diana.

Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN que codifica un líder secretor está unido operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma

está unido operativamente a una secuencia codificante si se sitúa de modo que facilita la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en el marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se realiza mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se usan adaptadores, enlazadores o cebadores oligonucleotídicos sintéticos para PCR según la práctica convencional.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica, que puede o no incluir regiones anteriores y posteriores a la región codificante, por ejemplo, secuencias 5' no traducidas (5' UTR) o "líder" y secuencias 3' UTR o "remolque", así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

10 Como se usa en la presente memoria, el término "recombinante" incluye la referencia a una célula o vector que se ha modificado mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga; además, el término "recombinante" también puede referirse a una célula que se deriva de una célula así modificada. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en forma idéntica dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otro modo se expresan de manera anormal, se subexpresan o no se expresan en absoluto como resultado de la intervención humana deliberada.

15

Como se usan en la presente memoria, los términos "transformada", "transformada de manera estable" o "transgénica", con referencia a una célula, significan que la célula tiene una secuencia de ácido nucleico no nativa (heteróloga) integrada en su genoma o tiene un plásmido episomal que se mantiene a través de múltiples generaciones.

20 Como se usa en la presente memoria, el término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual se produce un polipéptido basándose en la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto transcripción como traducción.

25 El término "introducida", en el contexto de la inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula, se refiere a cualquier método de inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula, incluyendo, pero sin limitarse a, métodos de "transfección", "transformación" y/o "transducción". El término "introducida" también incluye la referencia a la incorporación de una secuencia de ácido nucleico en una célula eucariota o procariota en donde la secuencia de ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertirse en un replicón autónomo o expresarse de manera transitoria (por ejemplo, ARNm transfectado).

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una neumolisina mutante purificada, como se define en la reivindicación 1.

30 Según un ejemplo no reivindicado, se proporciona una neumolisina mutante purificada que comprende: un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, en donde la secuencia de aminoácidos comprende una primera sustitución de aminoácidos de G293S en la posición 293 de la SEQ ID NO: 1 y una segunda sustitución de aminoácidos de L460D en la posición 460 de la SEQ ID NO: 1.

35 Vista desde un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende la neumolisina mutante purificada de la invención dispuesta en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones pueden usarse, por ejemplo, en vacunas dirigidas contra patógenos de enfermedades correspondientes, o pueden usarse en métodos de diagnóstico o cribado u otros métodos analíticos tales como métodos de detección.

40 Vista desde otro aspecto más, la presente invención proporciona una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la invención.

Vista desde otro aspecto más adicional, la presente invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica la neumolisina mutante purificada de la invención.

Vista desde otro aspecto aún más adicional, la presente invención proporciona una célula huésped que comprende la secuencia de ácido nucleico de la invención.

45 Los organismos que producen las formas nativas de CDC tienen varios efectos patológicos, incluyendo, pero sin limitarse a, los enumerados a continuación.

50 *Clostridium perfringens* es un agente causante de diversas enfermedades humanas y animales, a menudo caracterizadas por enterotoxemia o infecciones de tejidos blandos tales como gangrena gaseosa. La evidencia experimental sugiere un papel de la perfringolisina O en la mitigación de la respuesta inmunitaria afectando a la función de los neutrófilos.

*Bacillus cereus* (fuente de cereolisina O) es una causa infrecuente de infección no gastrointestinal grave, particularmente en adictos a drogas, los pacientes immunodeprimidos, neonatos y posquirúrgicos, especialmente cuando se insertan implantes protésicos tales como derivaciones ventriculares. Las infecciones oculares son los tipos

más comunes de infección grave, incluyendo endoftalmitis, anoftalmitis y queratitis, normalmente con la formación característica de abscesos del anillo corneal.

*Bacillus alvei* puede causar endoftalmitis y puede causar neumonía y empiema.

5 Se ha mostrado que *Streptococcus dysgalactiae* subesp. *equisimilis* está implicado en muchos tipos diferentes de síndromes de enfermedades humanas.

*Streptococcus canis* típicamente causa enfermedad en animales, principalmente perros. Puede causar enfermedad en seres humanos, lo más a menudo infecciones de tejidos blandos, bacteriemia, infecciones urinarias, infecciones óseas o neumonía.

10 *Streptococcus* causa una variedad de enfermedades que incluyen infección de garganta, fiebre reumática, infecciones de tejidos blandos (es decir, las bacterias comedoras de carne) y muchas otras. Se ha mostrado que la estreptolisina O es un factor patógeno principal en muchas de estas enfermedades.

La tetanolisina es producida por *Clostridium tetanus* que es la causa del tétanos.

*Listeria ivanovii* es una infección de animales y provoca principalmente aborto en ovejas.

15 *Listeria monocytogenes* causa enfermedad portada en alimentos en los seres humanos; la enfermedad portada por alimentos más grave causada por la misma es una meningitis. Es especialmente problemático para mujeres embarazadas en donde la infección puede ser subclínica en la madre, pero fatal para el feto. La listeriolisina es un factor patógeno crítico para estas enfermedades, sin ella, la bacteria es avirulenta.

20 *Streptococcus suis* es una causa de septicemia, meningitis, endocarditis, artritis y, ocasionalmente, otras infecciones en cerdos, y es cada vez más un problema en los seres humanos, se están notificando cada vez más brotes con síntomas que incluyen fiebre alta, malestar, náuseas y vómitos, seguido de síntomas nerviosos, hemorragia subcutánea, choque séptico y coma.

25 Se divultan mutantes no tóxicos de neumolisina nativa (tipo silvestre) ("PLY;" SEQ ID NO: 1) de *S. pneumoniae* (codificada por mutantes de la SEQ ID NO: 20). Estos mutantes de PLY presentan varias ventajas potenciales sobre el mutante de neumolisina (Pd-B) que se ha usado previamente para el desarrollo de vacunas, particularmente porque carecen sustancialmente de actividad hemolítica en comparación con la proteína PLY de tipo silvestre. Por ejemplo, las PLY mutantes de la presente invención carecen de la capacidad de unirse a membranas de mamíferos y, por tanto, no sufrirán ningún cambio estructural que normalmente resulta cuando la toxina PLY de tipo silvestre se une a la membrana (como lo hace el mutante Pd-B (Trp433Phe) descrito anteriormente).

30 Los mutantes de neumolisina eliminan cualquier actividad tóxica de la toxina, ya que no pueden unirse a células de mamíferos. Aunque el mutante de neumolisina Pd-B es aproximadamente 21.000 veces menos tóxico que la neumolisina nativa, todavía presenta suficiente toxicidad para ser problemático en el desarrollo de cualquier vacuna que lo incluya. Parece que el desarrollo moderno de vacunas contra *S. pneumoniae* se centra en usar neumolisina con otras proteínas derivadas de *S. pneumoniae*; así, parece que, independientemente de las otras proteínas utilizadas en la vacuna, se incluirá una neumolisina en todas las vacunas efectivas contra *S. pneumoniae* debido a su importancia para el establecimiento y la progresión de la enfermedad.

35 Como se describe más adelante, en la perfringolisina, una toxina relacionada con la neumolisina, se muestra que el undecapéptido de la proteína *no* media la unión de estas toxinas a la célula de mamíferos, al contrario que el conocimiento convencional. Las estructuras que *sí* median la unión son tres bucles hidrófobos cortos que están yuxtapuestos al undecapéptido. Según la invención, se sabe ahora que si un residuo de aspartato o glutamato cargado negativamente (por ejemplo) se coloca dentro de cualquier bucle hidrófobo individual (en una posición que no comprende ya un aspartato o glutamato), la unión de la neumolisina a la membrana se bloquea. Por lo tanto, esta mutación puntual única elimina la unión de la neumolisina a membranas de mamíferos. Por ejemplo, un único residuo de asparagina o glutamato sustituido por leucina 460 de neumolisina anula virtualmente por completo su actividad hemolítica. Puesto que en otros sistemas (descritos más adelante) se sabe que esta mutación bloquea la unión a la membrana de las células, elimina sustancialmente cualquier actividad tóxica (haciéndolo al menos 200 veces menos tóxico que el mutante Pd-B, por ejemplo), pero también elimina cualquier posible efecto secundario que podría estar causado por su unión a la superficie de las membranas de los mamíferos.

40 50 Las neumolisinas mutantes de la presente invención carecen de la actividad hemolítica y de la capacidad formadora de poros presentes en una proteína neumolisina de *S. pneumoniae* natural. Generalmente, el componente polipeptídico exhibe menos de aproximadamente un 30 %, menos de aproximadamente un 20 %, menos de aproximadamente un 10 %, menos de aproximadamente un 5 %, menos de aproximadamente un 1 %, menos de aproximadamente un 0,1 %, menos de aproximadamente un 0,001 % o menos de la actividad hemolítica de una proteína neumolisina de *S. pneumoniae* natural.

Las neumolisinas mutantes pueden tener sustituciones en uno o más de tres residuos que flanquean cualquier lado de las posiciones 293, 370, 406 o 460, incluyendo las posiciones 290, 291, 292, 294, 295, 296, 367, 368, 369, 371, 372, 373, 403, 404, 405, 407, 408, 409, 457, 458, 459, 461, 462 y 463.

Por ejemplo, estos residuos pueden sustituirse con un aminoácido cargado negativamente, glutamato o aspartato (excepto en la posición 403, que ya comprende aspartato), o un aminoácido cargado positivamente lisina, arginina o histidina (excepto en las posiciones 367 y 407, que ya comprende residuos de histidina). Alternativamente, estos residuos pueden sustituirse con cualquier otro aminoácido natural (incluyendo gly, ala, leu, ile, val, pro, trp, asn, gln, phe, tyr, met, cys, thr, o ser) que suprime la actividad de unión, formación de poros, y/o actividad hemolítica del mutante.

Como se ha indicado anteriormente, la secuencia de aminoácidos para la neumolisin de tipo silvestre es la SEQ ID NO: 1, y el complemento inverso del ADNc que codifica la neumolisin de la SEQ ID NO: 1 se muestra como la SEQ ID NO: 20. Los ADNc de neumolisinas mutantes (y complementos inversos de las mismas) se sustituyen según sea necesario para codificar las proteínas sustituidas (mutantes) descritas o habilitadas de otro modo en la presente memoria, y pueden comprender a su vez cualquier sustitución de base conservativa (nucleótido) para preparar ADNc que codifican tales mutantes.

Se apreciará que las secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos pueden alterarse con codones degenerados, pero codifican todavía los polipéptidos mutantes de la presente invención. Por consiguiente, los polinucleótidos que hibridan con las secuencias de polinucleótidos descritas en la presente memoria (o las secuencias complementarias de las mismas) pueden tener al menos un 90 % de identidad entre secuencias, o al menos un 95 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad.

Las Figuras 1A a 1E muestran un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las versiones nativas de las CDC identificadas en la presente memoria. Las secuencias se alinean a lo largo de los tres bucles hidrófobos correspondientes a las posiciones 367-373 (segundo bucle, L2), 403-409 (tercer bucle, L3) y 457-463 (primer bucle, L1) de neumolisin, representadas en la Fig. 1A-E como posiciones 586-592 (segundo bucle, L2), 622-628 (tercer bucle, L3) y 676-682 (primer bucle, L1). Como se indicó anteriormente, ciertos ejemplos particulares (pero no limitantes) pueden comprender sustituciones en una o más de estas posiciones por los aminoácidos cargados negativamente, ácido glutámico o ácido aspártico (excepto en donde la posición ya tiene un ácido aspártico), o por los aminoácidos cargados positivamente histidina, lisina o arginina (excepto por una histidina cuando la posición ya tiene una histidina, por una lisina cuando la posición ya tiene una lisina, o por una arginina cuando la posición ya tiene una arginina) o por cualquiera de los otros 15 aminoácidos naturales indicados anteriormente.

Los mutantes pueden comprender además más de una de las sustituciones descritas en la presente memoria de manera que el mutante tenga 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 residuos sustituidos en un único bucle (L1, L2, L3), o el mutante puede tener uno o más (1 a 7) residuos sustituidos en dos de los bucles (por ejemplo, L1 y L2, L1 y L3, L2 y L3), o uno o más residuos sustituidos (1 a 7) en cada uno de los tres bucles (L1, L2 y L3), en donde las sustituciones se seleccionan de las enumeradas en la presente memoria; por ejemplo, el mutante puede tener 1 a 7 sustituciones en el primer bucle (L1) y/o 1 a 7 sustituciones en el segundo bucle (L2) y/o 1 a 7 sustituciones en el tercer bucle (L3). Por ejemplo, cuando el residuo nativo está cargado positivamente, el residuo sustituido puede estar cargado negativamente, y cuando el residuo nativo está cargado negativamente, el residuo sustituido puede estar cargado positivamente. Alternativamente, el aspartato puede sustituirse con glutamato, histidina, arginina o lisina, o el glutamato puede sustituirse con aspartato, lisina, histidina o asparagina, o la arginina puede sustituirse con un aminoácido cargado positivamente diferente.

Las posiciones de aminoácidos del Bucle 1, Bucle 2 y Bucle 3 de cada CDC descrita en la presente memoria se enumeran en la Tabla 1.

**Tabla 1: Posiciones de aminoácidos correspondientes a bucles del dominio 4**

	SEQ ID NO.	Bucle 1	Bucle 2	Bucle 3
Neumolisin	1	457-463	367-373	403-409
Cereolisina	2	498-504	408-414	444-450
Antrolisin	3	501-507	411-417	447-453
Thuringiolisin	4	501-507	411-417	447-453
Perfringolisina	5	488-494	398-404	434-440

	SEQ ID NO.	Bucle 1	Bucle 2	Bucle 3
Alveolisina	6	490-496	400-406	436-442
Caniolisina	7	562-568	472-478	508-514
Equisimilisina	8	559-565	469-475	505-511
Estreptolisina O	9	559-565	469-475	505-511
Noviolisina	10	502-508	412-418	448-454
Tetanolisina	11	514-520	424-430	460-466
Ivanolisina	12	512-518	422-428	458-464
Listeriolisina O	13	513-519	423-429	459-465
Seeligeriolisina	14	514-520	424-430	460-466
Suiliisina	15	484-490	395-401	431-437
Mitilisina	16	457-463	367-373	403-409
Intermedilisina	17	515-521	425-431	461-467
PAF	18	651-657	561-567	597-603
Piolisina	19	521-527	431-437	467-473

Los mutantes o fragmentos antigenicos de los mismos pueden usarse en métodos analíticos para detectar la presencia de formas alternativas de las proteínas en muestras biológicas usando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, ELISA.

- 5 Se divultan ácidos nucleicos que codifican variantes alélicas de los mutantes de proteína, en donde las variantes alélicas de los mutantes de proteína difieren de los mutantes de proteína en menos del 15 % de su identidad de aminoácidos, por ejemplo, al menos el 85 % de los aminoácidos de la variante alélica son idénticos al mutante de proteína, y el 100 % de los aminoácidos en el primer, segundo y tercer bucles (L1, L2 y L3) son idénticos a los del mutante de proteína. Por ejemplo, las variantes alélicas pueden diferir de los mutantes de proteína en menos del 12 % de su identidad de aminoácidos, en menos del 10 % de su identidad de aminoácidos, en menos del 8 % de su identidad de aminoácidos, en menos del 6 % de su identidad de aminoácidos, en menos del 4 % de su identidad, en menos del 2 % de su identidad de aminoácidos, o en menos del 1 % de su identidad de aminoácidos de los mutantes de proteína descritos en la presente memoria.
- 10

15 Puede realizarse un alineamiento de secuencias seleccionadas con el fin de determinar el "% de identidad" entre dos o más secuencias, usando, por ejemplo, el programa CLUSTAL-W en MacVector versión 6.5, operado con parámetros por defecto, incluyendo una penalización por apertura de hueco de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,1 y una matriz de similitud BLOSUM 30.

20 El término "identidad de secuencia", como se usa en la presente memoria, significa que las secuencias se comparan como sigue. Las secuencias se alinean usando la versión 9 del GAP (programa de alineamiento global) del Grupo de Computación Genética, usando la matriz por defecto (BLOSUM62) (valores -4 a +11) con una penalización por apertura de hueco de -12 (para el primer nulo de un hueco) y una penalización por extensión de hueco de -4 (por cada nulo consecutivo adicional en el hueco). Después del alineamiento, se calcula el porcentaje de identidad expresando el número de coincidencias como un porcentaje del número de aminoácidos en la secuencia reivindicada.

25 Las composiciones inmunogénicas pueden incluir formulaciones de vacuna que se pueden usar en una cantidad eficaz para incitar (estimular) una respuesta inmune protectora en un animal. Por ejemplo, la generación de una respuesta inmune protectora puede medirse mediante el desarrollo de anticuerpos. Las cantidades de las neumolisinas mutantes

que pueden formar una respuesta inmune protectora están típicamente en una forma de dosificación unitaria de aproximadamente 0,001 µg a 100 mg por kg de peso corporal, tal como, pero no limitado a, de aproximadamente 0,01 µg a 1 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 10 µg/kg de peso corporal, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 1 a 6 semanas entre inmunizaciones.

- 5 Cualquiera de las composiciones inmunogénicas puede administrarse a un paciente infectado con un organismo patológico o predispuesto a infección con el organismo patológico. La composición inmunogénica es sustancialmente no tóxica (o sustancialmente no tóxica en comparación con la proteína PLY nativa), no se une sustancialmente a las membranas celulares, es sustancialmente no hemolítica y/o es tan estable como o es sustancialmente más estable que la proteína PLY.
- 10 Cualquiera de las composiciones inmunogénicas puede administrarse a un paciente infectado o a un paciente predispuesto a infección. La composición inmunogénica es sustancialmente no tóxica (o sustancialmente no tóxica en comparación con la proteína PLY nativa), no se une sustancialmente a las membranas celulares, es sustancialmente no hemolítica y/o es tan estable como o es sustancialmente más estable que la proteína PLY nativa. Los polipéptidos de neumolisina mutantes pueden tener aproximadamente 100.000 veces menos actividad hemolítica que el polipéptido de neumolisina de tipo silvestre. Los polipéptidos de neumolisina mutantes pueden tener aproximadamente 150.000 veces menos actividad hemolítica que el polipéptido de neumolisina de tipo silvestre. Los polipéptidos de neumolisina mutantes pueden tener aproximadamente 200.000 veces menos actividad hemolítica que el polipéptido de neumolisina de tipo silvestre. Los polipéptidos de neumolisina mutantes tienen aproximadamente 250.000 veces menos actividad hemolítica que el polipéptido de neumolisina de tipo silvestre. Los polipéptidos de neumolisina mutantes purificados tienen un rendimiento aumentado tras la purificación sobre un polipéptido de neumolisina mutante que tiene una sustitución en sólo una de las posiciones de aminoácidos 293, 294, 458, 459 y 460. El rendimiento recombinante aumentado puede ser, por ejemplo, al menos aproximadamente 10X, al menos aproximadamente 15X, al menos aproximadamente 17X o al menos aproximadamente 20X.

25 Las composiciones inmunogénicas pueden administrarse a animales que están infectados o pueden infectarse por los organismos patológicos descritos en la presente memoria, incluyendo, pero sin limitarse a, perros, gatos, conejos, roedores, caballos, ganado (por ejemplo, ganado vacuno, ovejas, cabras y cerdos), animales de zoológico, ungulados, primates y seres humanos.

30 Como se ha indicado anteriormente, la composición inmunogénica (tal como, pero sin limitarse a, una vacuna) puede administrarse a un sujeto para estimular una respuesta inmunogénica en el sujeto. La composición/vacuna inmunogénica puede comprender otras proteínas o subunidades de proteínas de *S. pneumoniae*, o puede comprender material polisacárido capsular combinado con o conjugado con los mutantes de neumolisina u otras proteínas en la composición/vacuna inmunogénica. Por ejemplo, el material capsular puede derivarse de uno cualquiera o más de los serotipos de *S. pneumoniae* los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 24F, 27, 33F o 34, u otros conocidos en la técnica. Como se ha indicado, la composición/vacuna inmunogénica puede comprender un adyuvante y/u otros excipientes farmacéuticamente aceptables. Los polisacáridos pueden conjugarse con el mutante, por ejemplo, a través de un enlace monomérico (solo un extremo del polisacárido está unido al polipéptido), un enlace en bucle (un único polipéptido está unido a polisacáridos en bucle) o un enlace cruzado (múltiples polisacáridos unidos a múltiples polipéptidos).

40 Las composiciones o vacunas inmunogénicas que contienen neumolisinas mutantes de la presente invención o fragmentos de las mismas, pueden usarse para tratar enfermedades y afecciones relacionadas con *Streptococcus pneumoniae*, tales como, pero no limitadas a, neumonía, meningitis, bacteriemia y otitis media.

En ciertas realizaciones, las neumolisinas mutantes son útiles para provocar la estimulación de la proliferación de las células T o la generación de anticuerpos a través de la estimulación de las células B.

45 Como se ha indicado anteriormente, una composición inmunogénica de la presente invención puede formarse combinando las neumolisinas mutantes con un excipiente farmacéuticamente (fisiológicamente) aceptable, tal como (pero no limitado a) solución salina fisiológica o soluciones salinas tamponadas a pH neutro (tal como solución salina tamponada con fosfato).

50 Por ejemplo, para composiciones de vacuna, los fragmentos son lo suficientemente grandes como para estimular una respuesta inmune protectora. El componente polipeptídico debe tener una longitud suficiente para inducir dicha respuesta inmunitaria potenciada. Para fragmentos de una proteína CDC de origen natural, los fragmentos tienen una longitud de al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 125, al menos aproximadamente 150, al menos aproximadamente 175, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 350, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 425, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 460, al menos aproximadamente 465 o más aminoácidos.

55 Los fragmentos pueden comprender porciones peptídicas de diferentes localizaciones de los mutantes que se han unido entre sí. Los fragmentos pueden incluir uno o más de los tres bucles analizados en la presente memoria.

Las neumolisinas mutantes también son útiles para generar anticuerpos neutralizantes que pueden usarse como suero inmunitario pasivo para tratar o mejorar síntomas en pacientes. Una composición inmunogénica como se describió anteriormente podría administrarse a un animal (tal como un caballo o un ser humano) hasta que se genere una respuesta de anticuerpos neutralizantes. Estos anticuerpos neutralizantes pueden recogerse después, purificarse y utilizarse para tratar pacientes que presentan síntomas.

Tales anticuerpos neutralizantes se administran a pacientes que presentan síntomas de enfermedad en una cantidad eficaz para neutralizar el efecto del patógeno. Los anticuerpos neutralizantes pueden administrarse por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, subcutánea y similares. Una vía particular es intravenosa, o para infección localizada, típicamente en el sitio de daño tisular con desbridamiento. El anticuerpo neutralizante también puede

10 administrarse junto con terapia antibiótica. El anticuerpo neutralizante puede administrarse hasta que se obtenga una disminución en el choque o daño tisular en una dosis única o dosis múltiples. La cantidad de anticuerpos neutralizantes administrada típicamente es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1.000 mg de anticuerpo por kg de peso corporal, tal como, pero sin limitarse a, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 200 mg de anticuerpo por kg de peso corporal.

15 Las composiciones inmunogénicas pueden prepararse como una composición farmacéutica que contiene una cantidad inmunoprotectora no tóxica de al menos una de las neumolisinas mutantes en un excipiente estéril y no tóxico farmacéuticamente aceptable.

20 Las composiciones inmunogénicas se pueden administrar al sujeto apropiado de cualquier manera adecuada conocida en la técnica, incluyendo (pero sin limitarse a) por vía oral, intramuscular, intravenosa, sublingual, mucosal, intraarterial, intratecal, intradérmica, intraperitoneal, intranasal, intrapulmonar, intraocular, intravaginal, intrarectal y/o subcutánea. Pueden introducirse en el tracto gastrointestinal o el tracto respiratorio, por ejemplo, mediante inhalación de una solución o polvo que contiene la composición inmunogénica. La administración parenteral, si se usa, se caracteriza generalmente por inyección. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, bien como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones.

25 Una composición inmunogénica (por ejemplo, una vacuna) se administra en una cantidad suficiente para incitar la producción de anticuerpos como parte de una respuesta inmunogénica. La dosificación para cualquier paciente dado depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, la salud general, el sexo, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se va a administrar, el tiempo y la vía de administración, y otros fármacos que se administran simultáneamente. La determinación de la dosificación óptima está dentro de las capacidades de un farmacólogo con conocimientos ordinarios. Un intervalo no limitante de cantidades eficaces de una neumolisina mutante que puede administrarse a un sujeto es, por ejemplo, de aproximadamente 10 ng de proteína a 100 mg por kg de peso corporal, tal como de aproximadamente 0,1 µg de proteína a aproximadamente 1 mg por kg de peso corporal. En al menos una realización no limitante, la dosificación proporcionada está en un intervalo de aproximadamente 0,25 µg a aproximadamente 25 µg de proteína, con o sin adyuvantes.

30 Cuando la composición inmunogénica se administra por vía parenteral, a través de la vía intramuscular o subcutánea profunda, la neumolisina mutante puede (en ciertas realizaciones particulares, pero no limitantes) mezclarse o absorberse con cualquier adyuvante convencional para atraer o potenciar la respuesta inmunitaria. Tales adyuvantes incluyen, pero no están restringidos a, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, dipéptido de muramilo, 40 lipopolisacáridos bacterianos y derivados y saponinas purificadas de QuilA. La proteína también puede presentarse al sistema inmunitario dentro de micropartículas tales como liposomas o complejos inmunoestimulantes (ISCOM). Como se ha indicado, una formulación que contiene los fragmentos de proteína/péptido mutante puede diseñarse para ingestión oral o intranasal.

45 La dosis terapéuticamente eficaz y no tóxica de las composiciones inmunogénicas puede ser determinada por un experto en la técnica. Por ejemplo, la dosis específica para cualquier sujeto puede depender de una variedad de factores que incluyen (pero no se limitan a) edad, salud general, dieta del paciente, tiempo y vía de administración, efectos sinérgicos con otros fármacos que se están administrando, y si la composición inmunogénica se administra repetidamente. Si es necesario, la composición inmunogénica se administrará repetidamente con intervalos de uno a tres meses entre cada dosis y con una dosis de refuerzo opcional más tarde en el tiempo. Los métodos reales de preparación de las formas de dosificación apropiadas son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, última edición.

50 Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos mutantes y fragmentos activos pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN (incluyendo, pero sin limitarse a, ADNc, ADN genómico y ADN sintético). El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario, puede ser la hebra codificante o la hebra no codificante (antisentido).

55 En la Tabla 2 se muestran secuencias de ADN (y secuencias de aminoácidos correspondientes) que codifican directamente (o codifican mediante el complemento inverso) las secuencias nativas de los CDC y, por lo tanto, que también pueden mutarse para formar las formas mutantes.

**Tabla 2: Secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de formas nativas de CDC**

	SEQ ID NO: (Aminoácidos)	SEQ ID NO: (Ácido nucleico)
Neumolisina	1	20
Cerolisina	2	21
Antrolisina	3	22
Thuringiolisina	4	23
Perfringolisina	5	24
Alveolisina	6	25
Caniolisina	7	26
Equisimilisina	8	27
Estreptolisina O	9	28
Noviolisina	10	29
Tetanolisina	11	30
Ivanolisina	12	31
Listeriolisina O	13	32
Seeligeriolisina	14	33
Suialisina	15	34
Mitilisina	16	35
Intermedilisina	17	36
PAF	18	37
Piolisina	19	38

Las células huésped se modifican por ingeniería genética (transducidas, transformadas y/o transfectadas) con los vectores que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido mutante de la presente invención. El vector 5 puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Las células huésped modificadas por ingeniería genética pueden cultivarse en medios nutriente convencionales que pueden modificarse según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar los polinucleótidos que codifican tales polipéptidos. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica. Los vectores incluyen 10 secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, por ejemplo, derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fago; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar y pseudorrabia. Sin embargo, puede usarse cualquier otro vector siempre que sea replicable y viable en el huésped.

La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en un sitio sitios de endonucleasa de restricción apropiado por procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos y otros se consideran dentro del alcance de los expertos en la técnica.

- 5 La secuencia de ADN en el vector de expresión está unida operativamente a una secuencia o secuencias de control de la expresión apropiadas (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Como ejemplos representativos de tales promotores, se pueden mencionar: promotor LTR o SV40, el lac o trp de *E. coli*, el promotor P<sub>L</sub> del fago lambda, y otros promotores conocidos para controlar la expresión de genes en células procariotas o eucariotas o sus virus. El vector de expresión también contiene un sitio de unión a ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.
- 10 Además, los vectores de expresión pueden contener uno o más genes de marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas tales como resistencia a dihidrofolato reductasa o neomicina para cultivo de células eucariotas, o tal como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.
- 15 El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, así como una secuencia promotora o de control apropiada, se puede emplear para transformar un huésped apropiado para permitir que el huésped exprese las proteínas.
- 20 Como ejemplos representativos (pero no limitantes) de huéspedes apropiados, se pueden mencionar: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como levadura; células de insecto, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales, tales como CHO, COS o melanoma de Bowes; adenovirus; células vegetales, etc. La selección de una célula huésped apropiada se considera que está dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente memoria.
- 25 Las construcciones recombinantes pueden comprender una o más de las secuencias como se describe y permite en la presente memoria. Las construcciones comprenden un vector, tal como un plásmido o vector viral, en donde se ha insertado una secuencia de polinucleótidos en una orientación directa o inversa. La construcción puede comprender además secuencias reguladoras, incluyendo, por ejemplo, un promotor unido operativamente a la secuencia. Los expertos en la técnica conocen grandes números de vectores y promotores adecuados, y están disponibles comercialmente. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo no limitante. Bacteriano: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen, Inc., Hilden, Alemania), pBS, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pBS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene, San Diego, CA); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia, Estocolmo, Suecia). Eucariota: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene, San Diego, CA), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia, Estocolmo, Suecia). Sin embargo, puede usarse cualquier otro plásmido o vector siempre que sean replicables y viables en el huésped.
- 30 Las regiones promotoras pueden seleccionarse de cualquier gen deseado usando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Los promotores bacterianos nombrados particulares incluyen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P<sub>R</sub>, P<sub>L</sub>, y T<sub>R</sub>. Los promotores eucariotas incluyen CMV temprano inmediato, timidina quinasa de HSV, SV40 temprano y tardío, LTR de retrovirus, y metalotioneína-1 de ratón. La selección del vector y promotor apropiados está dentro del nivel de experiencia ordinaria en la técnica.
- 35 Las células huésped que contienen las construcciones descritas anteriormente pueden ser una célula eucariota superior, tal como (pero sin limitarse a) una célula de mamífero; una célula eucariota inferior, tal como (pero sin limitarse a) una célula de levadura; o una célula procariota, tal como (pero sin limitarse a) una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula huésped puede efectuarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, electroporación (Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986) Elsevier Science Publishing Co., Inc., Nueva York, NY), o cualquier otra técnica adecuada.
- 40 Las construcciones en las células huésped pueden usarse de una manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Alternativamente, los polipéptidos pueden producirse sintéticamente mediante sintetizadores de péptidos convencionales.
- 45 Las proteínas maduras pueden expresarse en células de mamífero, levadura, bacterias u otras células bajo el control de promotores apropiados. También se pueden emplear sistemas de traducción libres de células para producir tales proteínas usando ARN derivados de las construcciones de ADN. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con huéspedes procariotas y eucariotas se describen por Green y Sambrook (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cuarta Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (2012)).
- 50 La transcripción del ADN que codifica los polipéptidos mutantes por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación pb 100 a 270, un potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

- Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permitan la transformación de la célula huésped, por ejemplo, el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural en 3'. Dichos promotores pueden derivarse de operones que codifican enzimas glicolíticas tales como 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), factor α, fosfatasa ácida o proteínas de choque térmico, entre otros. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en fase apropiada con secuencias de iniciación y terminación de la traducción. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación N-terminal que confiere características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.
- 5 Los vectores de expresión útiles para uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada junto con señales de iniciación y terminación de la traducción adecuadas en fase de lectura operativa con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores seleccionables fenotípicos y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y para, si se desea, proporcionar la amplificación dentro del huésped.
- 10 Como ejemplo representativo, pero no limitante, los vectores de expresión útiles para uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y un origen de replicación bacteriano derivados de plásmidos disponibles comercialmente que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J., EE. UU.) y pGEM1 (Promega, Madison, Wis., EE. UU.). Estas secciones de "esqueleto" de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural que se va a expresar.
- 15 Después de la transformación de una cepa huésped adecuada y el crecimiento de la cepa huésped a una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se induce por medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química), y las células se cultivan durante un periodo adicional.
- 20 Las células se recogen típicamente por centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos, y el extracto bruto resultante se retiene para purificación adicional.
- 25 Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden romperse mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, una prensa de French, ruptura mecánica o uso de agentes de lisis celular, tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, puede ser deseable (pero no limitante) usar células huésped que secretan los polipéptidos y permiten la recuperación del polipéptido del medio de cultivo.
- 30 También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar la proteína recombinante. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritas por Gluzman (Cell (1981) 23:175) y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados, y también cualquier sitio de unión a ribosomas necesario, sitio de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias no transcritas flanqueantes en 5'. Las secuencias de ADN derivadas de los sitios de corte y empalme y poliadenilación de SV40 pueden usarse para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.
- 35 40 Los polipéptidos pueden recuperarse y/o purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos de recuperación y purificación de proteínas bien conocidos. Dicha metodología puede incluir precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxilapatita y cromatografía en lectina. Las etapas de replegamiento de proteínas pueden usarse, según sea necesario, para completar la configuración de la proteína madura. A este respecto, se pueden usar chaperonas en dicho procedimiento de replegamiento. Finalmente, se puede emplear cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para las etapas de purificación finales.
- 45 Los polipéptidos mutantes que son útiles como inmunógenos en la presente invención pueden ser productos de procedimientos sintéticos químicos, o productos de técnicas recombinantes de un huésped procariota o eucariota (por ejemplo, mediante células bacterianas, de levadura, vegetales superiores, de insecto y de mamífero en cultivo), como se explicó anteriormente. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos mutantes pueden estar glicosilados o pueden estar no glicosilados.
- 50 55 Los polipéptidos expresados individualmente pueden aislar mediante métodos de expresión/aislamiento recombinante que son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos típicos para tales métodos de aislamiento pueden utilizar un anticuerpo frente a un área conservada de la proteína o frente a una etiqueta His o líder o cola escindible que se expresa como parte de la estructura de la proteína.
- Un fragmento es un polipéptido variante que tiene una secuencia de aminoácidos que es completamente la misma que una parte, pero no toda, de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos nativos o mutantes. Los fragmentos

5 pueden ser "independientes" o estar contenidos dentro de un polipéptido más grande del que el fragmento forma una parte o una región, tal como (pero sin limitarse a) como una única región continua. Los fragmentos no limitantes particulares son fragmentos biológicamente activos que son aquellos fragmentos que median actividades de los polipéptidos incluyendo aquellos con actividad similar o actividad mejorada o con una actividad disminuida. También se incluyen aquellos fragmentos que son antigenicos o inmunogénicos en un animal, particularmente un ser humano. Los fragmentos de una CDC mutante pueden tener, por ejemplo (pero no a modo de limitación), una longitud de al menos aproximadamente 20-100 aminoácidos, o una longitud de aproximadamente 100-200 aminoácidos.

10 Los ácidos nucleicos que codifican mutantes de CDC pueden hibridarse con la secuencia nativa correspondiente en condiciones de hibridación de alta astringencia. Un ejemplo de condiciones de alta astringencia incluye la hibridación a aproximadamente 42 °C en formamida al 50 %, 5 X SSC, solución de Denhardt 5 X, SDS al 0,5 % y 100 µg/ml de ADN portador desnaturalizado seguido de lavado dos veces en 2 X SSC y SDS al 0,5 % a temperatura ambiente y dos veces adicionales en 0,1 X SSC y SDS al 0,5 % a 42 °C.

#### Construcciones de ácido nucleico/vectores de expresión

15 Como se ha indicado, los ácidos nucleicos pueden incorporarse en construcciones o vectores de ácidos nucleicos heterólogos que son capaces de introducirse y replicarse en una célula huésped. Puede usarse cualquier vector siempre que sea replicable y viable en las células en donde se introduce. Los expertos en la técnica conocen grandes números de vectores y promotores adecuados, y están disponibles comercialmente. La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en un plásmido o vector (denominados colectivamente en la presente memoria "vectores") mediante una variedad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en un sitio o sitios apropiados de 20 endonucleasa de restricción por procedimientos estándar. Tales procedimientos y los procedimientos de subclonación relacionados se consideran dentro del alcance del conocimiento de los expertos en la técnica.

25 Las construcciones de ácido nucleico heterólogo pueden incluir la secuencia codificante para las neumolisin mutantes o fragmentos de las mismas: (i) aisladamente; (ii) en combinación con secuencias codificantes adicionales, tales como (pero sin limitarse a) secuencias codificantes de proteínas de fusión o péptidos señal, en donde la secuencia codificante de CDC mutante es la secuencia codificante dominante; (iii) en combinación con secuencias no codificantes, tales como (pero sin limitarse a) intrones y elementos de control, tales como elementos promotores y terminadores o regiones no traducidas en 5' y/o 3', eficaces para la expresión de la secuencia codificante en un huésped adecuado; y/o (iv) en un vector o entorno del huésped en donde la secuencia codificante de CDC mutante es un gen heterólogo.

30 Los vectores apropiados están equipados típicamente con una secuencia de ácido nucleico codificante de un marcador seleccionable, sitios de inserción y elementos de control adecuados, tales como secuencias promotoras y de terminación. El vector puede comprender secuencias reguladoras, incluyendo, por ejemplo, secuencias no codificantes tales como intrones y elementos de control, es decir, elementos promotores y terminadores o regiones no traducidas en 5' y/o 3', eficaces para la expresión de la secuencia codificante en células huésped (y/o en un vector o entorno de 35 célula huésped en donde una secuencia codificante de antígeno de proteína soluble modificada no se expresa normalmente), unidas operativamente a la secuencia codificante. Los expertos en la técnica conocen grandes números de vectores y promotores adecuados, muchos de los cuales están disponibles comercialmente.

40 Los promotores ejemplares incluyen tanto promotores constitutivos como promotores inducibles, ejemplos de los cuales incluyen un promotor de CMV, un promotor temprano de SV40, un promotor de RSV, un promotor de EF-1 $\alpha$ , un promotor que contiene el elemento sensible tet (TRE) en el sistema tet activado o tet desactivado, el promotor de beta actina y el promotor de metalotioneína que puede regularse al alza mediante la adición de ciertas sales metálicas. Una secuencia promotora es una secuencia de ADN que es reconocida por la célula huésped con fines de expresión. 45 Está unida operativamente a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido mutante.

A menos que se indique lo contrario, la práctica de las composiciones y métodos emplea técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de la experiencia de un experto en la técnica.

#### Ejemplos

50 A continuación, se proporcionan ejemplos en la presente memoria. Sin embargo, las realizaciones de la presente invención no están limitadas en su aplicación a la experimentación específica, resultados y procedimientos de laboratorio descritos en la presente memoria. Los Ejemplos pretenden ser ejemplares, no exhaustivos.

#### Ejemplo 1 no es según la invención.

55 Las citolisinas dependientes del colesterol (CDC) son una gran familia de toxinas polipeptídicas formadoras de poros producidas por más de 20 especies diferentes de bacterias Gram-positivas<sup>1</sup>. Inicialmente, las bacterias secretan estas toxinas como monómeros solubles en agua estables. El monómero se une a membranas y experimenta una secuencia específica de cambios estructurales, que promueve la oligomerización y la formación de poros. Como indica el nombre, el mecanismo de formación de poros de las CDC depende absolutamente del colesterol de la membrana para su mecanismo de formación de poros. El dogma durante varias décadas ha sido que el colesterol es el receptor de estas

toxinas y que el undecapéptido conservado, localizado en el dominio 4 (D4) de las CDC (Fig. 2), es importante para la interacción de las CDC con el colesterol<sup>2-4</sup>. Sin embargo, otros estudios han sugerido que el undecapéptido no media la unión inicial de estas CDC a membranas ricas en colesterol<sup>5,6</sup>. Por lo tanto, los componentes estructurales de estas CDC que median su unión al colesterol han sido confusos antes del presente trabajo.

- 5 La sensibilidad del mecanismo de las CDC a la oxidación se conoce desde hace más de 80 años<sup>7</sup> y este rasgo fue responsable del título de "citolisinas activadas por tiol" que se dio originalmente a estas toxinas (revisado en la referencia 8). La oxidación de este grupo tiol da como resultado una pérdida significativa de actividad citolítica, a menudo > 99 %. Posteriormente, se mostró mediante análisis de secuencia de un gran número de las CDC que la cisteína que tiene el grupo tiol sensible residía en el undecapéptido conservado (ECTGLAWEWWR-SEQ ID NO: 39), ya que esta es la única cisteína presente en la mayoría de las CDC secuenciadas. Se ha sugerido que la pérdida de la oxidación asociada a la actividad citolítica de este grupo tiol resulta de alteraciones en la unión a membranas ricas en colesterol<sup>2</sup>, estableciendo así una vinculación putativa entre la unión a membrana y el undecapéptido. La naturaleza altamente conservada del undecapéptido también sugirió una función altamente conservada, quizás mediando una interacción directa con el colesterol de la membrana.
- 10 15 El dogma de que el colesterol es el receptor para las CDC se complicó por el descubrimiento de la intermedilisina (ILY), una CDC que es secretada por *Streptococcus intermedius*. En contraste con otras CDC, ILY es específica de las células humanas<sup>9,10</sup>, una característica que se explica por su capacidad para unirse específicamente a CD59 humano, un inhibidor específico de especie del complejo de ataque a la membrana del complemento<sup>11,12</sup>, en lugar de membranas ricas en colesterol<sup>13</sup>. Por lo tanto, existen ahora al menos dos clases de CDC, ILY que se une a un receptor 20 no esterol específico y CDC de tipo PFO que se unen directamente a membranas ricas en colesterol. Sin embargo, los mecanismos citolíticos de ambos tipos de CDC son sensibles al colesterol de la membrana y ninguno es activo en membranas que están sustancialmente deplecionadas de colesterol<sup>14</sup>. Estos estudios, por lo tanto, presentaron un enigma; ¿el colesterol contribuye al mecanismo de ILY de una manera significativamente diferente que las CDC de tipo PFO, o existe una base molecular unificadora para la contribución del colesterol a ambas clases de CDC?
- 25 30 Giddings et al.<sup>14</sup> mostró que la depleción de colesterol de las membranas de hRBC bloqueaba la conversión de preporo a poro para todas las CDC, pero también afectaba la unión de las CDC de tipo PFO, a la membrana. Soltani et al.<sup>15</sup> mostró que la disrupción de la inserción en la membrana de los bucles L1-L3 de D4 (Fig. 2) de ILY bloquea también la conversión de preporo a poro. Por lo tanto, dos fenómenos distintos bloquean la conversión de preporo a poro en ILY, la depleción del colesterol de la membrana<sup>14</sup> y la disrupción de la inserción en la membrana de los bucles L1-L3<sup>15</sup>.
- 35 40 Basándose en estas observaciones, se realizó una investigación detallada de la interacción de los bucles de D4 y el undecapéptido de ILY y PFO con membranas. Los resultados de estos estudios indican que los bucles L1-L3 en la base del dominio 4 son las estructuras primarias que reconocen membranas ricas en colesterol, en lugar del undecapéptido. La interacción de estos bucles con membranas ricas en colesterol media la interacción de PFO con membranas ricas en colesterol, mientras que su inserción en la membrana también es necesaria para la conversión de preporo a poro tanto de PFO como de ILY. Por lo tanto, estos resultados proporcionan ahora la base estructural para la sensibilidad al colesterol de las CDC y proporcionan una explicación unificadora para el efecto del colesterol tanto en las CDC de tipo ILY como PFO, que usan diferentes receptores de membrana.

#### Materiales y métodos del Ejemplo 1

##### *Cepas bacterianas, plásmidos y productos químicos*

- 40 Los genes para ILY y PFO se clonaron en pTrcHisA (Invitrogen) como se ha descrito previamente<sup>14,16</sup>. Todas las mutaciones se hicieron en el fondo de ILY nativo (sin cisteína natural) o en PFO sin cisteína (PFO<sup>C459A</sup>). El PFO nativo contiene una cisteína en el residuo 459 que se ha cambiado a alanina para generar el derivado de PFO sin cisteína PFO<sup>C459A</sup>. Tanto PFO como PFO<sup>C459A</sup> muestran actividades citolíticas similares<sup>16</sup>. Todos los productos químicos y enzimas se obtuvieron de Sigma, VWR, y Research Organics. Todas las sondas fluorescentes se obtuvieron de Molecular Probes (Invitrogen).

##### *Generación y purificación de ILY y sus derivados*

- 50 Usando mutagénesis QuikChange de PCR (Stratagene), se realizaron diversas sustituciones de aminoácidos en ILY nativo o PFO<sup>C459A</sup>. Las secuencias de ADN de las versiones mutantes del gen de ILY se analizaron por la Instalación de Secuenciación de ADN Central de la Oklahoma Medical Research Foundation. La expresión y purificación de ILY recombinante y sus derivados de *Escherichia coli* se llevaron a cabo como se ha descrito<sup>15,16</sup>. La proteína eluida se dializó en tampón (NaCl 300 mM, MES 10 mM, EDTA 1 mM, pH 6,5) durante la noche a 4 °C. La proteína se almacenó después en DTT 5 mM y glicerol estéril al 10 % (vol/vol) a -80 °C.

##### *Modificación química de ILY y PFO y sus derivados con reactivos específicos de sulfhidrilo.*

- 55 Los derivados cisteína de ILY se modificaron con la sonda ambientalmente sensible yodoacetamido-*N,N'*-dimetil-*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazolil)etilen-diamina (NBD) a través del grupo sulfhidrilo. La reacción se llevó a cabo como se ha descrito previamente<sup>14</sup>. La proteína modificada se almacenó en glicerol estéril al 10 % (vol/vol), se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C. Las proteínas se marcaron con una eficiencia del 75 % o superior.

*Mediciones de fluorescencia*

Todas las mediciones de intensidad de fluorescencia se realizaron usando un espectrofluorímetro de recuento de fotones SLM-8100 como se ha descrito previamente<sup>16</sup>. Para las mediciones de NBD, se usaron una longitud de onda de excitación de 460-480 nm y una longitud de onda de emisión de 540 nm con un paso de banda de 4 nm. Se realizaron exploraciones de emisión de 500-600 nm para cada muestra a una resolución de 1 nm con un tiempo de integración de 1 s. Las muestras que contenían 10 µg de toxina total se incubaron con membranas de glóbulos rojos humanos fantasma (hRBC) (equivalente a 303,25 µg de proteína de membrana) en PBS [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, NaCl 137 mM, KCl 3 mM (pH 7,5)] a 37 °C durante 5-10 minutos antes de realizar las mediciones espectrales.

*Preparación de liposomas*

5 Se prepararon liposomas que contenían 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC; Avanti Polar Lipids) y colesterol en una proporción de 45:55 % en moles tal como se describió<sup>16</sup>.

*Preparación de membrana fantasma de HRBC*

10 Se prepararon membranas fantasma de HRBC como se describió previamente. El contenido de proteína de membrana se cuantificó usando el método de Bradford (Ensayo de Proteínas Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, Inc.) 15 también descrito previamente<sup>14,16</sup>.

*Depleción y repleción de colesterol*

20 La extracción de colesterol se realizó con metil-β-ciclodextrina (MβCD) como se describió previamente<sup>14</sup>. Brevemente, se incubaron membranas de huRBC fantasma humano con una concentración final de MβCD 20 mM-40 mM (recién preparada para cada uso) a 37 °C durante 2 horas. Las membranas se lavaron tres veces mediante centrifugación repetida (14.000 rpm durante 20 min a 4 °C) y se resuspendieron en PBS para eliminar el exceso de MβCD. Las membranas fantasma se suspendieron finalmente en PBS. El contenido de colesterol se midió usando el kit de cuantificación de colesterol/éster de colesterol (Calbiochem, Billerica, MA). Típicamente, el contenido de colesterol de las membranas disminuyó >90 % mediante este método.

25 La repleción de colesterol se realizó usando MβCD cargado con colesterol. Este método se ha descrito anteriormente<sup>14</sup>. Brevemente, se añadió MβCD recién preparado al tampón A (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, HEPES 10 mM, glucosa 5 mM, pH 6,5) hasta una concentración final de 5 mM. Se preparó una solución madre 100 mM de colesterol en una mezcla 1:2 (vol/vol) de cloroformo:metanol. Se calentó tampón A + MβCD hasta 80 °C en un recipiente de vidrio. Una vez calentado hasta 80 °C, se añadió colesterol suspendido a una concentración final de 4 mM. La solución se homogeneizó por sonicación (4 x 20 s). Después, la solución se filtró 30 usando un filtro de .22 µm. Se añadió MβCD cargado con colesterol a membranas fantasma sedimentadas deplecionadas de colesterol y se incubaron durante 2 horas a 37 °C. Las membranas se lavaron mediante centrifugación repetida como antes y finalmente, se resuspendieron en PBS.

*Inmovilización de liposomas en un chip sensor L1 de SPR*

35 La resonancia de plasmón superficial (SPR) se midió con un sistema BIACore 3000 usando un chip sensor L1 (BIACore, Uppsala, Suecia). El chip sensor L1 contiene una matriz de dextrano a la que se unen covalentemente residuos hidrófobos y se ha usado rutinariamente para la inmovilización de liposomas. En la preparación del chip L1 para liposomas, se inyectaron 10 µl de CHAPS 20 mM a un caudal de 10 µl/min. Los liposomas (concentración de lípido final 0,5 mM) se inyectaron después al mismo caudal durante 10 min. Después de la inyección de liposomas, se inyectó NaOH 50 mM 40 durante 3 min para eliminar las múltiples capas de lípidos. Esto fue seguido por inyección de 0,1 mg/ml de BSA para cubrir los sitios de unión no específica. Todas las inyecciones se realizaron a 25 °C. El chip L1 se regeneró y se retiraron los liposomas mediante inyecciones repetidas de CHAPS 20 mM y NaOH 50 mM hasta que se alcanzó la lectura original de RU. El procedimiento de regeneración no dio como resultado pérdida de la capacidad de unión del chip sensor.

*Análisis de SPR*

45 Todos los análisis de interacción entre los liposomas y los derivados de PFO se realizaron en HBS a 25 °C. Se inyectaron PFO de tipo silvestre (50 ng/µl) y los mutantes de aspartato de PFO (50 ng/µl) sobre el chip recubierto de liposomas a un caudal de 30 µl/min durante 4 minutos.

Resultados del Ejemplo 1

50 *Estrategia experimental.* La unión a membranas nativas de ILY no depende del colesterol de la membrana, pero su mecanismo sigue siendo sensible al colesterol. A diferencia de las CDC de tipo PFO que no se unen a membranas que carecen de colesterol, la unión al receptor y la oligomerización de ILY todavía se producen en membranas deplecionadas de colesterol<sup>14</sup>. Por lo tanto, se usó ILY para identificar en primer lugar estructuras que eran responsables de su dependencia del colesterol. Una vez identificadas las estructuras de ILY que eran sensibles al colesterol de la membrana, se examinó el efecto de la disrupción de estas estructuras en PFO sobre su capacidad

para unirse a membranas liposomales ricas en colesterol. De esta manera, se podría determinar si las mismas estructuras tanto en ILY como en PFO eran responsables de su dependencia del colesterol.

*No se requiere colesterol para la inserción en la membrana del undecapéptido de ILY.* Estudios previos con ILY han mostrado que el undecapéptido debe insertarse en la membrana con el fin de que se forme el preporo<sup>15</sup>. Por lo tanto, se determinó si su inserción era sensible o no al colesterol de la membrana. Se sustituyó un residuo de cisteína por Ala-486, que se localizaba dentro del undecapéptido, y se marcó con NBD a través de su grupo sulfhidrilo. Se ha mostrado que este residuo se inserta en la membrana en ILY nativa<sup>15</sup>. La intensidad de fluorescencia del NBD en ILY<sup>A486C-NBD</sup> se midió en ausencia y presencia de membranas que contenían colesterol o membranas deplecionadas de colesterol. Como se muestra en la Fig. 3, en presencia de membranas fantasma de hRBC, el undecapéptido se inserta en la membrana como se muestra por el aumento en la intensidad de emisión de fluorescencia en comparación con la observada para ILY en su estado soluble. Cuando la membrana se depleciona de colesterol, se observa el mismo aumento en la emisión de fluorescencia. Estos resultados demuestran que la inserción en la membrana de la región del undecapéptido cercana a Ala-486 es independiente del contenido de colesterol en la membrana.

*Se requiere colesterol para la inserción de los bucles L1, L2 y L3.* La inserción en la membrana de los tres bucles hidrófobos cortos en la punta de D4 (Fig. 2) se produce en concierto y se requiere para anclar y orientar apropiadamente los monómeros de CDC sobre la membrana<sup>15,17</sup>. Su inserción, en concierto con la inserción del undecapéptido, es necesaria para la posterior inserción en la membrana de las horquillas β transmembrana (TMH) de D3 que conduce a la formación del poro de barril β transmembrana<sup>15</sup>. El colesterol también se requiere para la inserción de las TMH y la formación del complejo de poro<sup>14</sup>. Por lo tanto, tanto el colesterol de la membrana como la inserción en la membrana de los bucles L1-L3 son requisitos previos para la conversión de preporo a poro<sup>14,15</sup>. Puesto que la inserción en la membrana de los bucles L1-L3 precede a la inserción de las TMH de D3, parecía razonable que la depleción del colesterol de la membrana puede bloquear la inserción de los bucles L1-L3 que, a su vez, impediría la inserción de las TMH de D3 y bloquearía la transición de preporo a poro. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que se requiere colesterol para la inserción en la membrana de los bucles L1-L3.

Para probar esta hipótesis, se midió individualmente la inserción en la membrana de los bucles L1-L3 en membranas fantasma de hRBC nativas y deplecionadas de colesterol. Recientemente, se ha mostrado que los residuos de ILY Leu-518, Ala-424 y Ala-464, situados dentro de los bucles L1, L2 y L3, respectivamente, se insertan en la membrana<sup>17</sup>. Para medir la inserción de cada bucle, se mutó un residuo en cada bucle a una cisteína (ILY<sup>A428C</sup>, ILY<sup>A464C</sup>, ILY<sup>L518C</sup>) y el grupo sulfhidrilo se derivatizó con NBD. A medida que el NBD localizado en estos sitios entra en la membrana, su intensidad de emisión de fluorescencia aumenta significativamente<sup>15,17</sup>. La intensidad de emisión del NBD se comparó entre toxina monomérica soluble, toxina unida a membranas fantasma de hRBC y toxina unida a membranas fantasma deplecionadas de colesterol.

En marcado contraste con el aumento en la intensidad de emisión de fluorescencia observado cuando cada bucle se inserta en la membrana de fantasmas de hRBC nativos, la depleción de aproximadamente el 90 % del colesterol de la membrana suprime la inserción en la membrana de los tres bucles (Fig. 4, paneles a-c). La restauración del colesterol en las membranas deplecionadas de colesterol restaura la capacidad de los bucles para insertarse en la membrana (Fig. 4, paneles d-f). Por lo tanto, se requiere colesterol en la membrana para la inserción de los bucles L1-L3 y, como se ha mostrado previamente, esta inserción es necesaria para la conversión de preporo a poro<sup>14,15</sup>.

*La sustitución de aspartato de los residuos en los bucles L1-L3 de PFO evita su unión a membranas ricas en colesterol.* La inserción en la membrana de los bucles L1-L3 de ILY fue sensible a la depleción de colesterol en membranas nativas, lo que sugiere que, en PFO, estos mismos bucles podrían mediar su unión directamente a membranas ricas en colesterol. Sin embargo, este problema no pudo abordarse en la PFO de una manera similar a la usada con ILY, ya que la depleción de colesterol disminuye la unión de PFO a la membrana. Por lo tanto, se determinó el efecto de mutar estos mismos bucles sobre la unión de PFO a liposomas ricos en colesterol. Esto se llevó a cabo mediante la introducción de aspartato en los bucles L1-L3 de PFO, que, previamente se había mostrado en ILY, que evita su inserción en la membrana<sup>15</sup>. La inserción de los bucles L1-L3 se acopla en ILY, y la introducción de un aspartato para cualquier residuo de bucle único, Ala-428 (L2), Ala-464 (L3) o Leu518 (L1), bloqueaba su inserción en la membrana. Por lo tanto, se predijo que, si se sustituyera aspartato por uno cualquiera de los residuos análogos en PFO, Ala-401, Ala-437 o Leu-491, se alteraría la unión de PFO a liposomas ricos en colesterol.

La sustitución individual de los residuos análogos en PFO, Ala-401 (L2), Ala-437 (L3) y Leu-491 (L1), dio como resultado una pérdida mayor del 99,7 % de la actividad hemolítica para cada mutante (datos no mostrados). La unión de los mutantes de PFO a liposomas de colesterol-PC se midió por resonancia de plasmón superficial (SPR). Como se muestra en la Fig. 5a, estas mutaciones redujeron significativamente la unión a liposomas de colesterol-PC cuando se examinaron por SPR. La sustitución de aspartato por Ala-401 (L2) o Leu-491 (L1) suprimió completamente la unión de PFO a las membranas de los liposomas, y la unión por el aspartato sustituido con Ala-437 (L3) fue menor del 7 % de la de tipo silvestre (Fig. 5b). Este resultado indica que los bucles L1-L3 de D4 son críticos para la interacción de las CDC de tipo PFO con membranas ricas en colesterol.

*La modificación de Cys-459 de PFO bloquea la inserción en la membrana de los residuos de triptófano del undecapéptido, pero no la unión a la membrana de PFO.* Se ha pensado desde hace tiempo que el undecapéptido conservado de las CDC de tipo PFO participa en su unión a membranas ricas en colesterol, principalmente porque se

informó que la modificación química del grupo sulfhidrilo de la cisteína nativa (Cys-459) del undecapéptido afecta significativamente a la unión de PFO a números celulares bajos de RBC de oveja, pero no a números celulares altos<sup>2</sup>. Otros, sin embargo, han mostrado que su modificación no parece afectar la unión de otras CDC a las células<sup>5,6</sup>. Por lo tanto, se compararon por SPR las capacidades de PFO nativos y PFO modificados a través del grupo sulfhidrilo de Cys-459 del undecapéptido para unirse a liposomas de colesterol-PC.

La modificación del tiol de Cys-459 del undecapéptido de PFO con el reactivo específico de sulfhidrilo N-ethylmaleimida (NEM) redujo la actividad hemolítica en un 99 % (datos no mostrados), similar a otros informes en donde el sulfhidrilo de cisteína de PFO y SLO se modificaron químicamente<sup>2,18</sup>. La tasa y grado de la unión, sin embargo, de la toxina modificada con NEM aumentó con respecto a la de la toxina nativa, según se determinó mediante análisis de SPR (Fig. 6A-B). Por lo tanto, la modificación química de Cys-459 no disrupió la unión de PFO a la membrana.

Si la modificación de la Cys-459 no afectaba a la unión, se planteaba la cuestión de lo que esta modificación hacía a PFO que bloqueaba eficazmente su actividad. Desde el descubrimiento de las CDC hace casi 90 años, se sabe que su mecanismo citolítico era sensible a la oxidación. El residuo sensible a la oxidación se vinculó finalmente al residuo de cisteína del undecapéptido altamente conservado<sup>1</sup>. Los efectos estructurales de la modificación de la cisteína sobre el PFO se examinaron adicionalmente para determinar si su modificación evitaba un cambio estructural en PFO que podría afectar a su actividad. La inserción en la membrana de los triptófanos de undecapéptido 464, 466 y 467 está conformacionalmente acoplada a la inserción de los TMH de D3. Estudios previos han mostrado que las mutaciones en los residuos de TMH1 de D3 que aumentan su tasa de inserción también aumentan la tasa de inserción en la membrana de los residuos de triptófano del undecapéptido<sup>19</sup>. Puesto que Cys-459 está yuxtapuesta a los residuos de triptófano, se determinó si la modificación química del grupo tiol de la cisteína bloqueaba la inserción en la membrana de los residuos de triptófano.

La inserción en la membrana de los residuos de triptófano del undecapéptido puede monitorizarse mediante el aumento en su intensidad de fluorescencia intrínseca a medida que se mueven al entorno no polar de la membrana<sup>20,21</sup>. La inserción de estos triptófanos se midió en el PFO modificado con NEM y nativo (Fig. 6a y 6b). La modificación de Cys-459 bloqueó la inserción de los triptófanos del undecapéptido, pero no le impidió formar un oligómero resistente a SDS, similar al PFO nativo (datos no mostrados). Por lo tanto, estos datos muestran que el cambio conformacional en la estructura de PFO que se refleja por la pérdida de la inserción de los residuos de triptófano del undecapéptido afecta a la posterior conversión del oligómero de preporo en el complejo de poro.

#### Inmunización con el mutante de neumolisina Leu 460Asp

Se inmunizaron ratones CBA/CAHN-XID por vía subcutánea con 5 µg de neumolisina o mutante de neumolisina, usando alumbre (hidróxido de aluminio) como adyuvante en los días 0 y 14. El día 21, los ratones se inmunizaron con las proteínas en diluyente solo (sin adyuvante). Todas las inyecciones se administraron en un volumen de 0,2 ml. El día 35, los ratones se pulsaron con la cepa 19F de tipo capsular EF3030. Siete días después, los ratones se sacrificaron con gas dióxido de carbono. Los pulmones se homogeneizaron y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en los pulmones de cada ratón sembrando en placas el tejido homogeneizado en placas de agar sangre. Los ratones también se sangraron. No se observaron neumococos en la sangre, demostrando que este es un modelo de neumonía y no neumonía y sepsis. Los resultados muestran que tanto la neumolisina de tipo silvestre como la mutante eran capaces de proteger contra la neumonía en un modelo de neumonía focal en ratones (Fig. 7).

Dos características distintivas consolidadas de las CDC son la dependencia de su mecanismo formador de poros en la presencia de colesterol de membrana y la inactivación reversible de la mayoría de las CDC por oxidación de la cisteína del undecapéptido. Los estudios de la presente memoria resuelven la base molecular para ambos fenómenos. Sin desear estar limitado por la teoría, la inserción en la membrana de los bucles L1-L3, localizados en la base del dominio 4, parece ser el evento principal que es sensible a la presencia de colesterol en la membrana para ILY. Tras la depleción del colesterol, estos bucles no se insertan en la membrana y, como se ha mostrado previamente, la extracción de colesterol de las membranas de hRBC<sup>15</sup> evita la conversión de preporo a poro de ILY. Estos resultados indican que ambos efectos resultan también de la incapacidad de estos bucles para insertarse en membranas deplecionadas de colesterol. Estos datos indican además que la oxidación de la cisteína conservada en PFO, y presumiblemente otras CDC de tipo PFO, bloquea la inserción en la membrana de los residuos de triptófano que atrapan PFO en un estado preporo, pero no afecta a la unión a liposomas ricos en colesterol.

El descubrimiento de ILY, una toxina específica de células humanas presentó un enigma de cómo podría discriminar ILY entre células humanas y animales si el colesterol fuera su receptor. La especificidad celular humana de ILY se explicó por el descubrimiento de que CD59 humano, una etapa tardía, inhibidor del complemento específico de especie, era su receptor<sup>13</sup>. Aunque el colesterol no era el receptor de ILY, su mecanismo formador de poros permanecía sensible al colesterol de la membrana<sup>14</sup> y mostró que se requería colesterol para una etapa mucho más tardía del mecanismo formador de poros en ILY; la depleción sustancial del colesterol de la membrana bloqueó la conversión de preporo a poro. Curiosamente, esto también se observó para SLO y PFO<sup>14</sup> dos CDC que pueden unirse directamente a membranas ricas en colesterol. Aunque la depleción del colesterol de la membrana de hRBC bloqueaba la conversión de preporo a poro de PFO, también disminuía la unión de PFO. Por lo tanto, el colesterol es necesario para la conversión de preporo a poro para las tres CDC y además también contribuye a la unión a la membrana por las CDC de tipo PFO.

Recientemente, Soltani et al.<sup>15</sup> mostró que la inserción en la membrana de los bucles L1-L3 de D4 de ILY es necesaria para la conversión de preporo a poro. Por lo tanto, tanto el colesterol como la inserción en la membrana de los bucles L1-L3 eran necesarios para la conversión de preporo a poro de ILY. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los datos presentados en la presente memoria indican que una explicación unificadora para estas observaciones es que la inserción en la membrana de estos bucles solo se produce en membranas ricas en colesterol, y esta inserción es necesaria para la conversión de preporo a poro de tanto de tipo ILY como de las CDC tipo PFO. Además, la capacidad de estos bucles para insertarse en membranas ricas en colesterol también media la unión inicial de PFO, y presumiblemente las CDC de tipo PFO, a superficies de membrana ricas en colesterol. Por lo tanto, estos datos indican que tanto en ILY como en CDC de tipo PFO, los bucles L1-L3 deben insertarse en la membrana con el fin de la formación exitosa del complejo de poros. En el caso de ILY, la unión está mediada primero por huCD59 seguido de la inserción de los bucles L1-L3 en membranas ricas en colesterol, mientras que estos dos eventos, unión e inserción, son uno y el mismo en PFO y están mediados principalmente por los bucles L1-L3.

Tradicionalmente, se ha aceptado que el undecapéptido de las CDC de tipo PFO contribuía o mediaba directamente el reconocimiento de membranas ricas en colesterol<sup>2,3,21</sup>. Los estudios de la presente memoria indican que los bucles L1-L3 son las estructuras primarias que median la interacción entre las CDC y las membranas ricas en colesterol. Aunque la modificación química de la cisteína del undecapéptido de PFO con NEM disminuye su actividad hemolítica en más del 99 %, su unión a liposomas de colesterol-PC está en gran medida inalterada. Por lo tanto, en contraste con el dogma existente, la interacción de PFO, y otras CDC de tipo PFO, está mediada principalmente por los bucles L1-L3 y no por el undecapéptido. Las mutaciones dentro del undecapéptido podrían influir en la interacción de L1-L3 con membranas ricas en colesterol. Se ha mostrado que la mutación del Trp-491 del undecapéptido de ILY bloquea la inserción de L1-L3<sup>15</sup> y la estructura alterada del undecapéptido de ILY nativo aparentemente evita la interacción directa de L1-L3 con membranas ricas en colesterol, permitiendo así que se una primero a huCD59. Esta última idea se refuerza por el hecho de que cuando la estructura del undecapéptido consenso se introduce en ILY, permite que se una a células no humanas<sup>22</sup>.

Es curioso por qué los bucles L1-L3 de ILY no median la unión a membranas ricas en colesterol de manera similar a PFO. Como se ha sugerido anteriormente, parece que la principal diferencia en el dominio 4 entre ellos es la estructura primaria del undecapéptido altamente conservado. Está claro que ILY ha perdido la capacidad de unirse directamente a membranas ricas en colesterol; de lo contrario, no exhibiría la especificidad por células humanas mediada por huCD59. Las estructuras cristalinas de D4 de ILY y PFO pueden proporcionar una explicación de esta diferencia en los bucles L1-L3 para mediar la unión directa de estas dos CDC a membranas ricas en colesterol. La localización y orientación de los residuos de L1-L3 (Leu-518, Ala-428, y Ala-464) de ILY son casi idénticas a los residuos análogos en PFO (Leu-491, Ala-401, y Ala-437) (Fig. 4b). De hecho, la mayor parte de la estructura de D4 de las dos CDC es casi idéntica (desviación rms de menos de 0,6 Å, referencia 23), con la excepción del bucle del undecapéptido y una estructura de lengua β en la parte superior del dominio 4. El bucle del undecapéptido de ILY se extiende hacia abajo desde la base de D4 4-5 Å más allá del undecapéptido de PFO. Por lo tanto, el undecapéptido de ILY puede impedir estéricamente la interacción de los bucles L1-L3 de ILY con la superficie rica en colesterol. Quizás sólo después de la unión al receptor, la estructura del undecapéptido de ILY se altera de tal manera que permite la inserción de los bucles L1-L3.

La presente divulgación revela una base estructural para el efecto severo sobre la actividad que muestra la oxidación de la cisteína del undecapéptido sobre el mecanismo citolítico de PFO, y presumiblemente otras CDC de tipo PFO. Originalmente, las CDC se denominaron citolisinas activadas por tiol debido a esta característica, pero la base molecular para este efecto era desconocida. Estudios iniciales sugirieron que la unión a RBC se vio afectada, pero al mismo tiempo la unión al colesterol no se vio afectada, y aún se observaron oligómeros no líticos en la superficie de las células<sup>2</sup>. Como se muestra en la presente memoria, esta modificación evita la inserción de los triptófanos del undecapéptido y da como resultado una estructura oligomérica atrapada en preporo. Aunque no se conoce la base estructural precisa para este efecto, estudios previos han mostrado que la inserción en la membrana de las TMH del dominio 3, que forman el poro de barril β transmembrana, está conformacionalmente acoplada a la inserción en la membrana de los residuos de triptófano del undecapéptido del dominio 4<sup>19</sup>. Por lo tanto, evitar la inserción en la membrana de estos triptófanos puede evitar la inserción de los TMH del dominio 3, atrapando así PFO en el estado de preporo.

#### Ejemplo 2

Se purificaron PLY<sub>tipo silvestre</sub> y mutantes de PLY (PLY<sub>L460D</sub> y PLY<sub>L460D/G293S</sub>) etiquetados con His usando una columna de afinidad. El rendimiento promedio de proteínas fue PLY<sub>tipo silvestre</sub>: 1 mg/ml, PLY<sub>L460D</sub>: 1 mg/ml, y PLY<sub>L460D/G293S</sub>: 4 mg/ml. Las proteínas purificadas se ensayaron para determinar su actividad hemolítica por incubación de toxinas tituladas en serie con glóbulos rojos humanos (RBC). La CE<sub>50</sub> (la concentración eficaz requerida para lisar el 50 % de los RBC) se calculó para cada proteína a partir de una curva sigmoidal no lineal de respuesta a la dosis. Se determinó las veces de cambio de PLY de tipo silvestre para cada mutante (veces de cambio = CE<sub>50</sub> tipo silvestre/CE<sub>50</sub> mutante). Los resultados se informan para los dos mutantes de PLY como que son más de una cierta veces menos activos que PLY de tipo silvestre ya que la lisis de del 100 % de RBC requerida para una curva de respuesta a la dosis precisa no se pudo obtener a las concentraciones de proteína más altas de estos derivados. La disminución en la actividad hemolítica del mutante en comparación con la proteína de tipo silvestre (veces menos activa que PLY<sub>tipo silvestre</sub>) para PLY<sub>L460D</sub> fue > 10.000 veces y para PLY<sub>L460D/G293S</sub> > 260.000 veces.

La estabilidad relativa de una proteína se deduce del cálculo de la temperatura de fusión ( $T_m$  Celsius), la temperatura a la que el 50 % de la proteína se ha desplegado. Las curvas de fusión de proteínas se generaron usando un kit de Colorante de Ensayo de Desplazamiento Térmico de Proteínas (Applied Biosystems). A medida que aumenta la temperatura, la proteína se despliega y el colorante es capaz de unirse a regiones hidrófobas expuestas y emitir fluorescencia.

5 La  $T_m$  para PLY<sub>tipo silvestre</sub>, PLY<sub>L460D</sub>, y PLY<sub>L460D/G293S</sub> fue  $47,50 \pm 0,2$ ,  $47,69 \pm 0,2$ ,  $47,97 \pm 0,2$ , respectivamente. Las diferencias insignificantes en las  $T_m$  reportadas para las tres proteínas PLY indican que la introducción de las mutaciones indicadas en PLY<sub>tipo silvestre</sub> no tuvo ningún efecto sobre la estabilidad de las proteínas.

Como se indicó anteriormente, la neumolisina es un mutante doble designado como PLY-L460D/G293S (PLY<sub>L460D/G293S</sub>) en donde la L de la posición 460 se sustituye con D y la G de la posición 293 se sustituye con S. Por sí misma, la sustitución G293S solo disminuye la actividad hemolítica del mutante de PLY en aproximadamente 50 veces. La sustitución L460D, por sí misma, disminuye la actividad del mutante de PLY en aproximadamente 5.000-10.000 veces. Pero en un mutante de PLY con ambas sustituciones, la disminución en la actividad supera 260.000 veces menos que la toxina PLY nativa. Esta es una disminución geométrica, no meramente una disminución "aditiva" en la actividad.

10 15 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, esta disminución abrupta de la actividad se debe al bloqueo de dos funciones esenciales de PLY. En primer lugar, la sustitución L460D bloquea la unión al colesterol y, en segundo lugar, la sustitución G293S atrapa PLY en un estado de preporo que no puede insertar el poro del barril  $\beta$  (el preporo se define como monómeros unidos a la membrana que se han oligomerizado en la estructura similar a un anillo, pero no puede insertar el poro del barril  $\beta$ ). Por lo tanto, el efecto inhibidor es geométrico:  $50 \times 5.000-10.000 > 250.000$  veces menos tóxico (menos hemolítico), que está de acuerdo con mediciones que indican que es  $>260.000$  veces menos tóxico que PLY nativo. La sustitución G293S también estabiliza la estructura monomérica de la proteína mutante L460D y aumenta el rendimiento tras la purificación. Por ejemplo, tras la purificación a partir de un cultivo de *E. coli* de 1,0 litro, el rendimiento del mutante PLY-L460D/G293S fue de aproximadamente 52 mg frente a 3 mg del mutante PLY-L460D (aproximadamente 17X mayor).

20 25 El polipéptido de neumolisina mutante de la invención tiene actividad hemolítica reducida y actividad formadora de poros reducida en comparación con un polipéptido de neumolisina de tipo silvestre. La secuencia de aminoácidos de la neumolisina mutante purificada comprende la SEQ ID NO: 40. El polipéptido de neumolisina mutante tiene un rendimiento aumentado con respecto a una neumolisina de tipo silvestre o con respecto a un polipéptido de neumolisina mutante que tiene una sustitución en sólo una de las posiciones de aminoácidos 293, 294, 458, 459 y 460. El polipéptido de neumolisina mutante puede tener aproximadamente 250.000 veces menos actividad hemolítica que un polipéptido de neumolisina de tipo silvestre.

30 35 En otros aspectos de la invención, la neumolisina mutante según la reivindicación 1 se dispone en un excipiente farmacéuticamente aceptable para formar una composición inmunogénica. Una vacuna incluye la composición inmunogénica y opcionalmente contiene un adyuvante. Una secuencia de ácido nucleico codifica cualquiera del polipéptido de neumolisina mutante según la reivindicación 1. Una célula huésped incluye dicha secuencia de ácido nucleico.

## REFERENCIAS

Las siguientes referencias son procedimientos ejemplares u otros detalles suplementarios a los expuestos en la presente memoria.

- 5 1. Alouf, J.E., Billington, S.J. y Jost, B.H. Repertoire and general features of the cholesterol-dependent cytolsins en *Bacterial Toxins: A Comprehensive Sourcebook* (eds. Alouf, J. E. y Popoff, M. R.) 643-658 (Academic Press, Londres, 2005).
2. Iwamoto, M., Ohno-Iwashita, Y. y Ando, S. Role of the essential thiol group in the thiol-activated cytolsin from *Clostridium perfringens*. *Eur J Biochem* **167**, 425-430 (1987).
- 10 3. Sekino-Suzuki, N., Nakamura, M., Mitsui, K.I. y Ohno-Iwashita. Y. Contribution of individual tryptophan residues to the structure and activity of theta-toxin (perfringolysin O), a cholesterol-binding cytolsin. *Eur J Biochem* **241**, 941-947 (1996).
4. Jacobs, T. et al. The conserved undecapeptide shared by thiol-activated cytolsins is involved in membrane binding. *FEBS Lett.* **459**, 463-466 (1999).
- 15 5. Vazquez-Boland, J.A., Dominguez, L., Rodriguez-Ferri, E.F., Fernandez-Garayzabal, J.F. y Suarez, G. Preliminary evidence that different domains are involved in cytolytic activity and receptor (cholesterol) binding in listeriolysin O, the *Listeria monocytogenes* thiol-activated toxin. *FEMS Microbiol Lett* **53**, 95-9 (1989).
6. Saunders, F.K., Mitchell, T.J., Walker, J.A., Andrew, P.W. y Boulnois, G.J. Pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for *in vitro* activity. *Infect. Immun.* **57**, 2547-2552 (1989).
- 20 7. Neill, J.M. y Fleming, W.L. Studies on the oxidation and reduction of immunological substances: II The hemotoxin of the *Welch bacillus*. *J. Exp. Med.* **44**, 215-226 (1926).
8. Alouf, J.E. y Geoffrey, C. Structure activity relationships in the sulfhydryl-activated toxins, en *Bacterial Protein Toxins* (eds. Alouf, J.E., Fehrenbach, F.J., Freer, J.H. y Jeljaszewicz, J.) 165-171 (Academic Press, Londres, 1984).
9. Nagamune, H. et al. Intermedilysin. A cytolytic toxin specific for human cells of a *Streptococcus intermedius* isolated from human liver abscess. *Adv Exp Med Biol* **418**, 773-775 (1997).
- 25 10. Nagamune, H. et al. Intermedilysin, a novel cytotoxin specific for human cells secreted by *Streptococcus intermedius* UNS46 isolated from a human liver abscess. *Infect Immun* **64**, 3093-3100 (1996).
11. Rollins, S.A., Zhao, J., Ninomiya, H. y Sims, P.J. Inhibition of homologous complement by CD59 is mediated by a species-selective recognition conferred through binding to C8 within C5b-8 or C9 within C5b-9. *J Immunol* **146**, 2345-51 (1991).
- 30 12. Rollins, S.A. y Sims, P.J. The complement-inhibitory activity of CD59 resides in its capacity to block incorporation of C9 into membrane C5b-9. *J Immunol* **144**, 3478-83 (1990).
13. Giddings, K.S., Zhao, J., Sims, P.J. y Tweten, R.K. Human CD59 is a receptor for the cholesterol-dependent cytolsin intermedilysin. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 1173-1178 (2004).
- 35 14. Giddings, K.S., Johnson, A.E. y Tweten, R.K. Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolsins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11315-11320 (2003).
15. Soltani, C.E., Hotze, E.M., Johnson, A.E. y Tweten, R.K. Specific protein-membrane contacts are required for prepore and pore assembly by a cholesterol-dependent cytolsin. *J. Biol. Chem.* Artículo en prensa 282 (21), 15709-15716, abr. 5, 2007.
- 40 16. Shepard, L.A. et al. Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated pore-forming toxin *Clostridium perfringens* perfringolysin O: an  $\alpha$ -helical to  $\beta$ -sheet transition identified by fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **37**, 14563-14574 (1998).
17. Ramachandran, R., Heuck, A.P., Tweten, R.K. y Johnson, A.E. Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolsin. *Nat Struct Biol* **9**, 823-7 (2002).
- 45 18. Harris, J.R., Adrian, M., Bhakdi, S. y Palmer, M. Cholesterol-Streptolysin O Interaction: An EM Study of Wild-Type and Mutant Streptolysin O. *J Struct Biol* **121**, 343-55 (1998).
19. Heuck, A.P., Hotze, E., Tweten, R.K. y Johnson, A.E. Mechanism of membrane insertion of a multimeric b-barrel protein: Perfringolysin O creates a pore using ordered and coupled conformational changes. *Molec. Cell* **6**, 1233-1242 (2000).

20. Heuck, A.P., Tweten, R.K. y Johnson, A.E. Assembly and topography of the prepore complex in cholesterol-dependent cytolsins. *J Biol Chem* **278**, 31218-31225 (2003).
- 5 21. Nakamura, M., Sekino, N., Iwamoto, M. y Ohno-Iwashita, Y. Interaction of theta-toxin (perfringolysin O), a cholesterol-binding cytolsin, with liposomal membranes: change in the aromatic side chains upon binding and insertion. *Biochemistry* **34**, 6513-6520 (1995).
22. Nagamune, H. et al. The human-specific action of intermedilysin, a homolog of streptolysin o, is dictated by domain 4 of the protein. *Microbiol Immunol* **48**, 677-92 (2004).
- 10 23. Polekhina, G., Giddings, K.S., Tweten, R.K. y Parker, M.W. Insights into the action of the superfamily of cholesterol-dependent cytolsins from studies of intermedilysin. *Proc Natl Acad Sci* **102**, 600-605 (2005).
24. Rossjohn, J., Feil, S.C., McKinstry, W.J., Tweten, R.K. y Parker, M.W. Structure of a cholesterol-binding thiol-activated cytolsin and a model of its membrane form. *Cell* **89**, 685-692 (1997).
25. Humphrey, W., Dalke, A. y Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **14**, 33-8, 27-8 (1996).
26. Anónimo: Prevention of Pneumococcal Disease: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). Morbidity and Mortality Weekly Report-Recommendations and Reports: **46**:1-24 (abr. 4, 1997).

**REIVINDICACIONES**

1. Una neumolisina mutante purificada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 40.
2. Una composición inmunogénica que comprende:
  - la neumolisina mutante purificada de la reivindicación 1; y
  - 5 un excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la reivindicación 2.
4. La vacuna de la reivindicación 3 que comprende además un adyuvante.
5. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la neumolisina mutante purificada de la reivindicación 1.
6. Una célula huésped que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 5.

ES 2 993 430 T3

Figure 1A

Figure 1B

Cerebellina	VRRTYPGAVQ	LANKAFADNQ	PSLIVAKRK P	LNSIDLPGM	- RKENITITVQ	NPTYGNAGA	VDDLVSTWNE	177
Antroisina	VRRTYPGAVQ	LANKAFADNQ	PSLIVAKRK P	LNSIDLPGM	- RKENITITVQ	NPTYGNAGA	VDDLVSTWNE	180
Thuringiellina	ANRTYPGAVQ	LANKAFADNQ	PSLIVAKRK P	LNSIDLPGM	- RKENITITVQ	NPTYGNAGA	VDDLVSTWNE	180
Perflingisina	NDRTYPGALQ	LADKAFVENR	PTLIVMVKRP	ININIDLPGL	- KGENSIVD	OPTYGVSGA	IDEVLVSKWNE	167
Alveolisina	TNRTYPGAIQ	LANKDFADNQ	PSLIVMAARK P	LDISIDLPGL	- KNEINTSVQ	NPNYGTVSSA	IDQLVSTWGE	169
Canicisina	TORTYPAAHQ	LANKCFTEHQ	POAVVTERNP	QKIHIDLPGM	- GDRATVEVN	DPTYANVSTA	IDNLVHQWHD	241
Equisimilisina	TORTYPAAHQ	LANKCFTEHQ	POAVVTERNP	QKIHIDLPGM	- GDRATVEVN	DPTYANVSTA	IDNLVHQWHD	238
Estreptolisina O	TORTYPAAHQ	LANKCFTEHQ	POAVVTERNP	QKIHIDLPGM	- GDRATVEVN	DPTYANVSTA	IDNLVHQWHD	238
Noviolisina	NDKRTYPGAIQ	LANRNLIEHQ	PNIUSCERKP	ITISIDLPGM	- GEZECKTT	IT SPTYSSVRA	IDSLNKWNS	181
Tetanolisina	NDRTYPGAIQ	LANRNEHEN	POIISCKERP	ITISIDLPGM	- AEDGKXVN	SPTYSSVNSA	INSIDLTWNS	193
Ivanolisina	ASUTYPGALV	KANSELVENQ	PDVLPVKRDS	VTISIDLPGM	VNHDBNEIVVQ	NATKSNINDG	VNTLVDRWNN	190
Listeriolisina	SSITYPGALV	KANSELEVENQ	PDVLPVKRDS	LTISIDLPGM	TNQDBNKIVK	NATKSNVNNA	VNTLVERWNE	191
Seeligeriolisina	SSLITYPGALV	KANREEVENQ	PNVLPVKRDS	LTSVVDLPGM	YKKDNKIFVK	NPTKSNVNNA	VNTLVERWNE	192
Sullisia	AANIYPGALL	RADQNLIDNN	PTLISIARGD	ITISINILPGI	ANGDSHTVWN	SPTRSTVRTG	VNNLISKWNN	163
Neurotisina	DSRLYPGALL	VVDETELLEN	PTLLAVDRAP	MTYSIDLPGL	ASSDSFLQVE	DPSNSSVRGA	VNDLLAKWHQ	136
Mitellisina (PLY)	dsrltypgall	vvdelellen	ptllavdrap	mtysidlpq	assdsflqve	dpsnssvrga	vnndllakwhq	136
Intermediolisina	DDRIFPGALL	KADQSELLEN	PTLIPVNRCX	TTISVNLPGI	KNGESNLTE	NPSNSTVRTA	VNNLVERWIO	194
Vridanolisina	NQNVFILGGY	KANQNELLENQ	PELISLARAK	GTVSVDLPGM	HSSENKEIA	NPTTSGMQUEA	MNTLVEKWTK	330
Piolisina	NAHVVYPGALV	LANKDELKGS	PTSIGIARAP	QTVSVDLPGI	VDCRNKVVIN	NPTKSSVTQG	INGLDCWIQ	195
Cerebellina	KYSTTH-TLP	ARMQYTESMV	YSKSQI1ASAL	NWNAKYLDNS	ENIDENAVAN	GEKKVMVAAY	KQIFFYVSAE	246
Antroisina	KYSTTH-TLP	ARMQYTESMV	YSKSQI1ASAL	NWNAKYLDNS	ENIDENAVAN	GEKKVMVAAY	KQIFFYVSAE	249
Thuringiellina	KYSETH-TLP	ARTQYTESMV	YSKSQI1SSAL	NWNAKYLDNS	ENIDENAVAN	GEKKVMVAAY	KQIFFYVSAE	249
Perflingisina	KYSSTH-TLP	ARTQYTESMV	YSKSQI1SSAL	NWNAKYLDNS	ENIDENAVAN	GEKKVMVAAY	KQIFFYVSAE	249
Alveolisina	KYSSTH-TLP	ARLQYAESMV	YSQMQ1SSAL	NWNAKVNLGT	EGIDENAVAN	GEKKVMVAAY	KQIFFYVSAE	236
Canicisina	NYSGCN-TLP	ARTQYTESMV	YSKSQ1EEAL	NWNNSKILDGT	EGIDENAVAN	GEKKVMVAAY	KQIFFYVSAE	238
Equisimilisina	NYSGCN-TLP	ARTQYTESMV	YSKSQ1EEAL	NWNNSKILDGT	EGIDENAVAN	GEKKVMVAAY	KQIFFYVSAE	238
Tetanolisina O	NYSGCN-TLP	ARTQYTESMV	YSKSQ1EEAL	NWNNSKILDGT	EGIDENAVAN	GEKKVMVAAY	KQIFFYVSAE	238
Intermediolisina	HYSSIV-SIP	TRFSYSDSMV	YSKSQLSAKL	GCNFKALNA	EGIDENAVAN	GEKKVMVAAY	KQIFFYVSAE	238
Vridanolisina	KYSSSKY-TIP	TRMSYSDTMV	Y5SQLSQLSAAV	GCNFKALNA	EGIDENAVAN	GEKKVMVAAY	KQIFFYVSAE	238
Wandolisina	KYSEZYPNIS	AKIDYDQEMMA	YSESQQLVAKF	GAFAKAVNS	ENVNFGAISE	GKVQEVINF	KQIYYTVNN	260
Listeriolisina	KYAQAYPNVS	AKIDYDDEMA	YSESQQLVAKF	GAFAKAVNS	ENVNFGAISE	GKVQEVISF	KQIYYVNNNN	261
Seeligeriolisina	KYSKAYPNIN	AKIDYDDEMA	YSESQQLVAKF	GAFAKAVNS	ENVNFEAISD	GKVQEVISF	KQIYYVNNNN	262
Sullisia	TYAGEYCNHQ	AELQYDETMA	YSMSQLKTRF	GTSFEKIAV	EDINFDAVNS	GEKQVQI1VNF	KQIYYTVNN	233
Neurotisina	DYQQVN-NVP	ARMQYEKITA	HSMEQLKVKF	GSDFEKTGS	EDIDENSVHS	GEKQI1Q1VNF	KQIYYTVNN	205
Mitellisina (PLY)	dyqqvn-nvp	armqyekita	hsmeqlkvkf	gsdfektgs	idafnsvh	gekqiqivnf	kqiyiytvsvd	205
Intermediolisina	KYSKTH-AVP	ARMQYESISA	QSMSQLQAKF	GADFSKVGAP	ENVDFFSSVH	GEKQVEIANF	8QVYVYASVD	263
Vridanolisina	NYSSSH-SVP	ARVQYESTTA	YSMNQLKAKF	GADFEKACAP	EXIDFEAVQK	GERQIEVVNF	KQIYYVATFD	399
Piolisina	RNSK-YPDHA	AKISYDTEMV	TSKRQLEAKI	GIGFEKVSAK	ENVDFFDAIK	GERQVALASF	KQIYYVYASVD	265

Figura 1C

Cereolissina	LPNNPSDELFD	NSVTFDELTR	KGVNSAPPV	MVSNAVAYCRT	IYVKLEYTTSK	SKDVQAAFKALIK	--NNS	312
Anthroliissina	LPNNPSDELFD	NSVTFDELTR	KGVNSAPPV	MVSNAVAYCRT	IYVKLEYTTSK	SKDVQAAFKALIK	--NNS	315
Thuringiolissina	LPNNPSDELFD	NSVTFDELTR	KGVNSAPPV	MVSNAVAYCRT	IYVKLEYTTSK	SKDVQAAFKALIK	--NNS	315
Peringolissina	LPKNPSDLFD	DSVTENDLKQ	KGVSNAPPV	MVSNAVAYCRT	IYVKLEYTTSK	SKDVQAAFKALIK	--NND	302
Aheolissina	LPNNPSDELFD	DSVTFAELAR	KGVSNAPPV	MVSNAVAYCRT	IYVKLEYTTSK	SKDVQAAFKALIK	--NND	304
Canolissina	LPNNPADEVFD	KSVTKEELQA	KGVSNAPPV	MVSNAVAYCRT	IYVKLEYTTSK	SKDVQAAFKALIK	--GTD	376
Equisimilissina	LPNNPADEVFD	KSVTKEELQR	KGVSNAPPV	MVSNAVAYCRT	IYVKLEYTTSK	SKDVQAAFKALIK	--GTD	373
Estrepolissina O	LPNNPADEVFD	KSVTFKDQLQ	KGVSNAPPV	MVSNAVAYCRT	IYVKLEYTTSK	SKDVQAAFKALIK	--GTD	373
Noviolissina	APNHPSDFFC	BKVTFNDLAK	KGVNSKNPPV	YVSSVSYCRT	IYVKLEYTTSK	SANVKAFAKALIE	--NON	315
Tetanolissina	PPNRPSDLFC	DSVTFDELAL	KGNNNNPPA	YVSNVAYCRT	IYVKLEYTTSK	SSHVKAFAKALIN	--NQD	328
Planolissina	EPTSPSRFFC	KSVTKENLQA	LGVNAENPPA	YISSVAYCRD	IYVKLEYTTSK	STEVKAABFTAFK	--GKS	326
Listeriolissina	EPTRPSRFFC	KAVTKEQLQA	LGVNAENPPA	YISSVAYCRQ	IYKLSTNSH	STEVKAABDAAVS	--GKS	327
Seeligerolissina	EPTPSKFFC	GSVTKEQLQ	LGVNAENPPA	YISSVAYCRQ	IYKLSSSH	SNKVKTAAFAAAMS	--GKS	328
Sauvillissina	EPEPSXKFFA	EGFTVDEDLKR	NGITDEVPPV	YVSSVSYCRS	MFIKLETSSR	STQVQAAFKALIK	--GVD	299
Neumediolissina	AVKNPQDVFQ	DTVTYEDLKQ	RGISAERPLV	YISSVAYCRQ	VYKLEYTTSK	SDEVEAAFEALIK	--GVX	271
Mitissina (PLY)	avknpgdvvq	dvtvedlq	rgisadrplv	yissvaycrq	VYKLEYTTSK	sdeveaafealik	--9VK	271
Intemediolissina	SPNSPSAFLFC	SGTYPIDUIN	RGVMSKTPPV	YVSNVSYCRQ	MYVKFEITTSK	STEVQAAIBAVVK	--GAK	329
Viridianolissina	APINPAAYFD	KSVTPEDLKQ	RGVDSQTPPV	YVSNVSYCRQ	IYVKFESTTSK	STELKAAINAVIDK	--GAT	465
Piolissina	TPSPHSVFC	PNTAQDILD	RGVNNKNPLC	YISSVSYCRQ	IYVKLEYTTSK	SKDVQAAFKALIK	--NND	335
Cereolissina	VEISQYKD!	FEESTFTAVV	LGCGDAEHNK	VVTKDFNEIR	LNKPAYPISY	TSTFLKONST	382	
Anthroliissina	VEISQYKD!	FEESTFTAVV	LGCGDAEHNK	VVTKDFNEIR	LNKPAYPISY	TSTFLKONAT	385	
Thuringiolissina	VEISQYKD!	FEESTFTAVV	LGCGDAEHNK	VVTKDFNEIR	LNKPAYPISY	TSTFLKONAT	385	
Peringolissina	IKNSSQYKD!	YENSSFTAVV	LGCGDAEHNK	VVTKDFNEIR	LNKPAYPISY	TSTFLKONAT	385	
Aheolissina	IQASCQYKD!	YENSSFTAVV	LGCGDAEHNK	VVTKDFNEIR	LNKPAYPISY	TSTFLKONAT	385	
Canolissina	VKTNGKYS!	LENSSFTAVV	LGADAAEHNK	VVTKDFNEIR	LNKPAYPISY	TSTFLKONAT	385	
Equisimilissina	VKTNGKYS!	LENSSFTAVV	LGADAAEHNK	VVTKDFNEIR	LNKPAYPISY	TSTFLKONAT	385	
Estrepolissina O	VKTNGKYS!	LENSSFTAVV	LGADAAEHNK	VVTKDFNEIR	LNKPAYPISY	TSTFLKONAT	385	
Noviolissina	ISSNSEYKN!	LNQSSFTAVV	LGCGAEEHNK	VVTKDFNEIR	LNKPAYPISY	TSTFLKONAT	385	
Tetanolissina	ISSNAYYKD!	LNQSSFTAVV	LGCGAEEHNK	VVTKDFNEIR	LNKPAYPISY	TSTFLKONAT	385	
Planolissina	VKDDTELEN!	IQNASEKAVI	YCCSADKEV	IQDSDLSKIR	DILKQGANFD	KKNPGVPIAY	TINFLKDNQI	446
Listeriolissina	VSGDVELNI	IKNSSEKAVI	YCCSADKEVQ	IIDGNLGDIR	DILKQGANFD	KKNPGVPIAY	TINFLKDNQI	443
Seeligerolissina	VKGDVELYN!	IKNSSEKAVI	YCCSADKEVQ	IIDGNLGDIR	DILKQGANFD	KKNPGVPIAY	TINFLKDNQI	443
Sauvillissina	ISGNAEYQD!	IKNTSSKAVI	YCCSADKEVQ	IIDGNLGDIR	DILKQGANFD	KKNPGVPIAY	TINFLKDNQI	443
Neumediolissina	VAPQTEWKQ!	LDNTEVKAVI	LGCGPSGAR	VVTGKVDNVE	DILQECRSRT	ADHPGCLPISY	TISFLRDNVV	341
Mitissina (PLY)	vapetewkq!	ldntevkav!	19gdpssgar	vvtgkvdnve	dilqecrsrt	adhpgilpisy	tisflrdnvv	341
Intemediolissina	IKACTEYEN!	IKNTKITAVV	LGCGPCEASK	VITCNIDILK	DILQGNSNFS	AQSPAVPISY	TISFLRDNVV	399
Viridianolissina	IAPNSEWSRL	IKNTSVTAVI	VCCNASCACK	VVTCTVENLK	ELIREGANFS	AQSPAVPISY	KTAFLKDQAC	535
Piolissina	TEFKAKYADI	LNKTRATVYA	VCCSARGVE	VATGMIDALK	KIKEESTYS	AVNFLKDNQI	405	

Figura 10

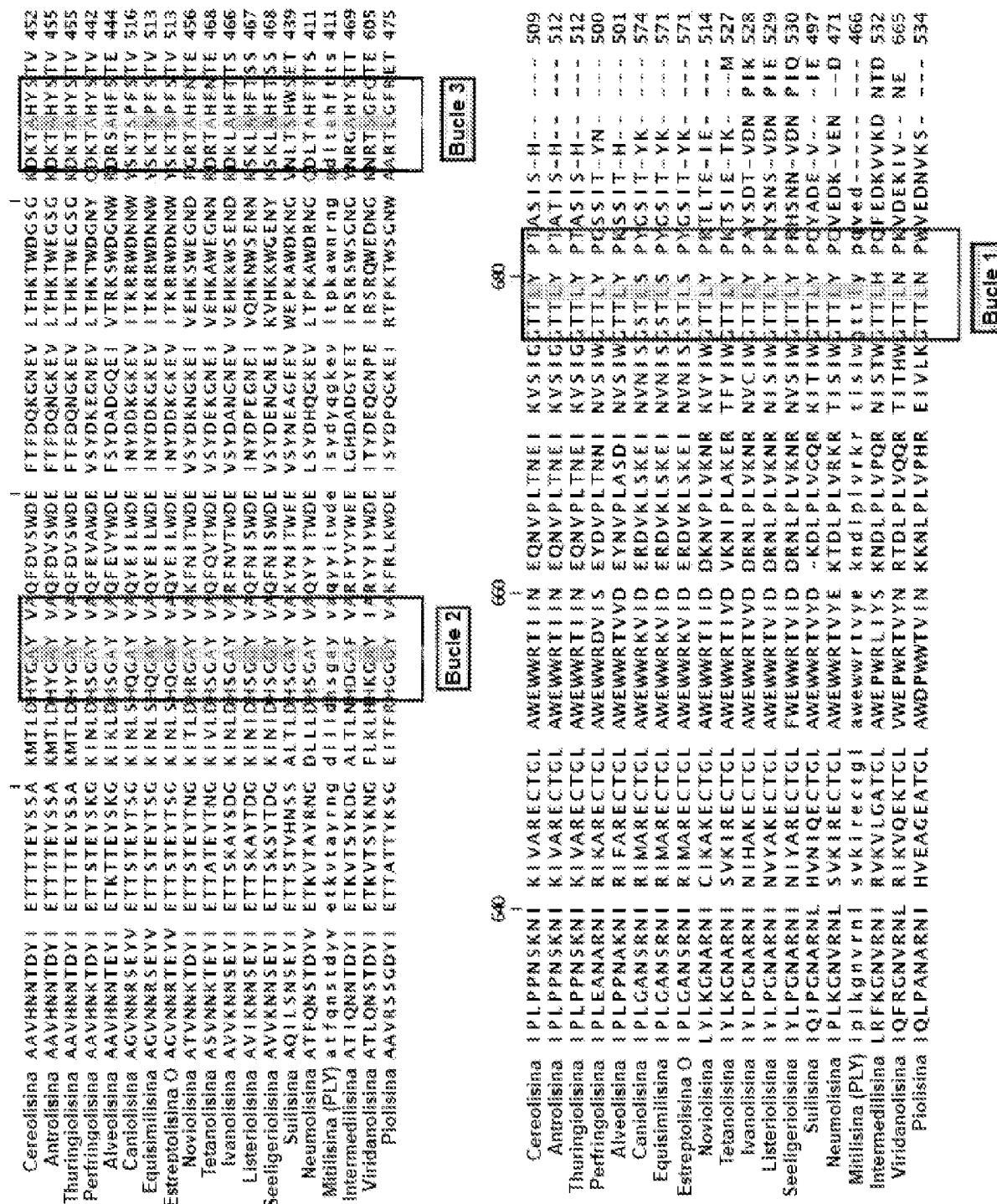


Figura 1E

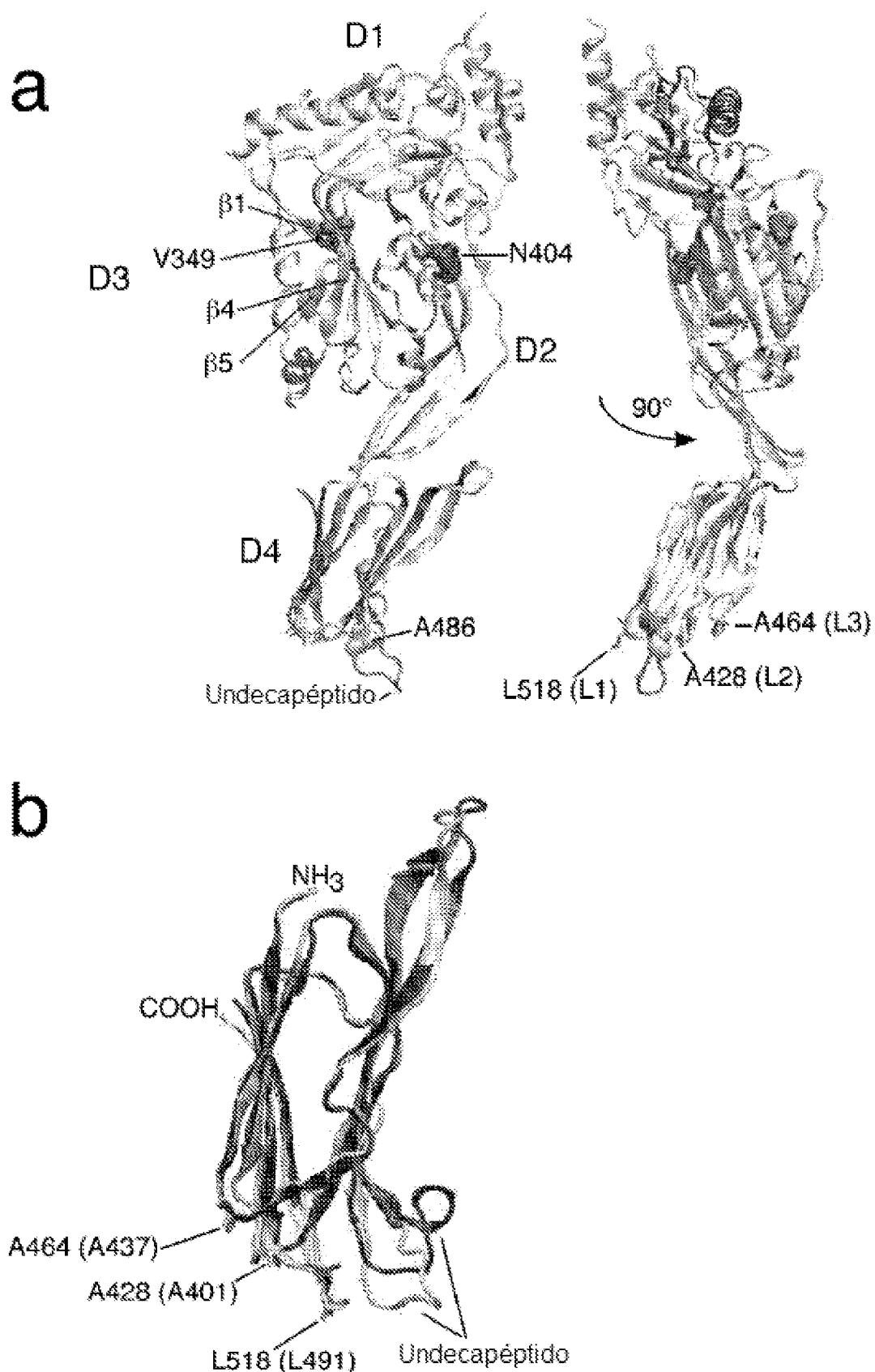


Figura 2

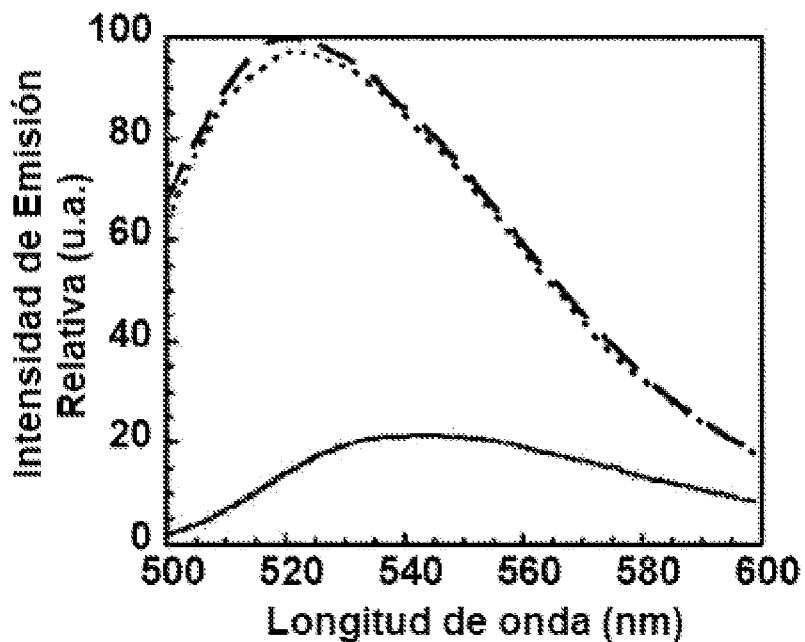


Figura 3

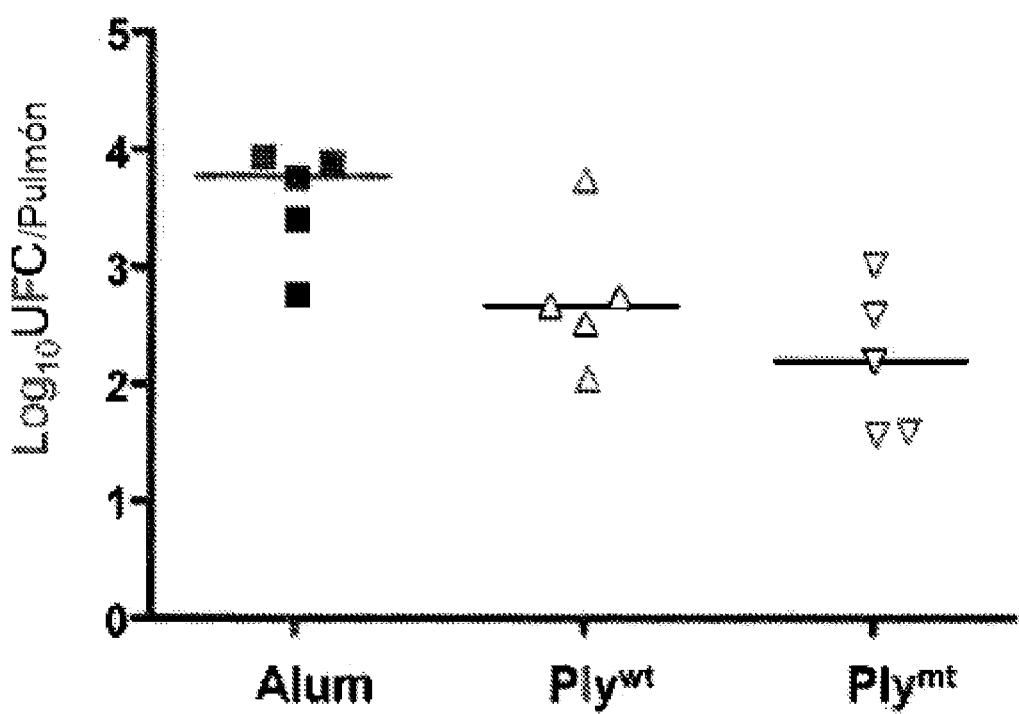


Figura 7

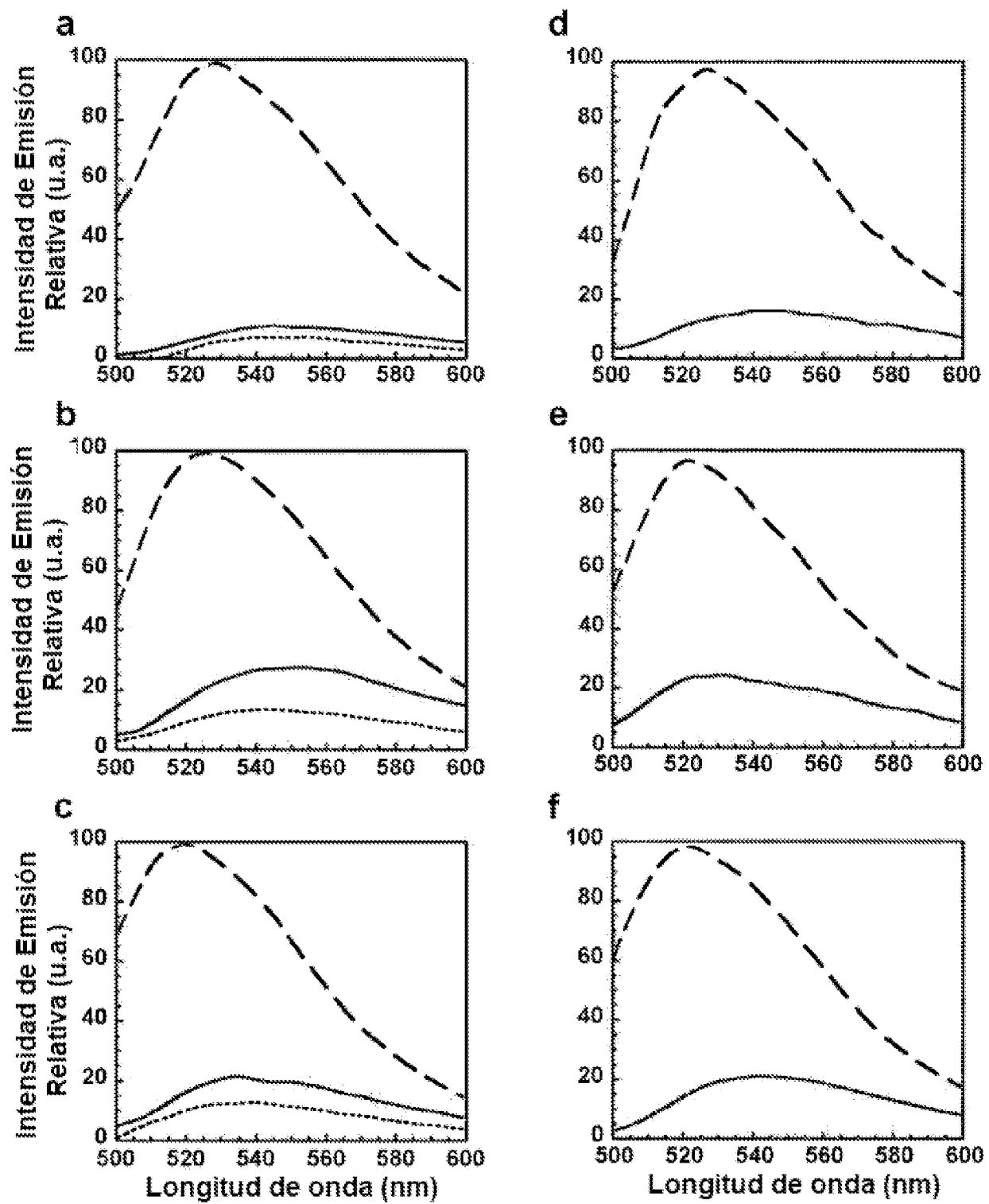


Figura 4

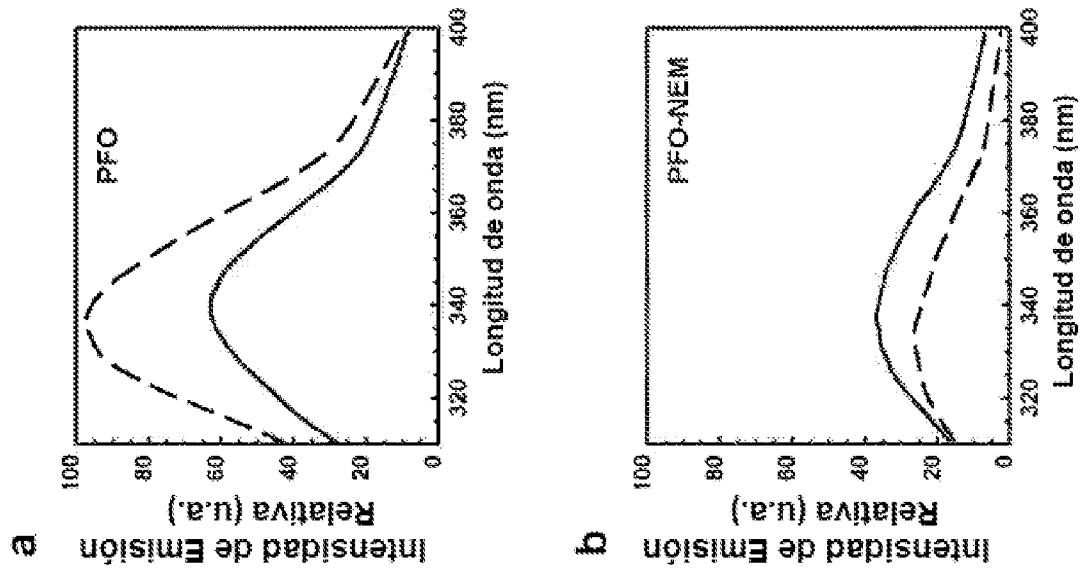
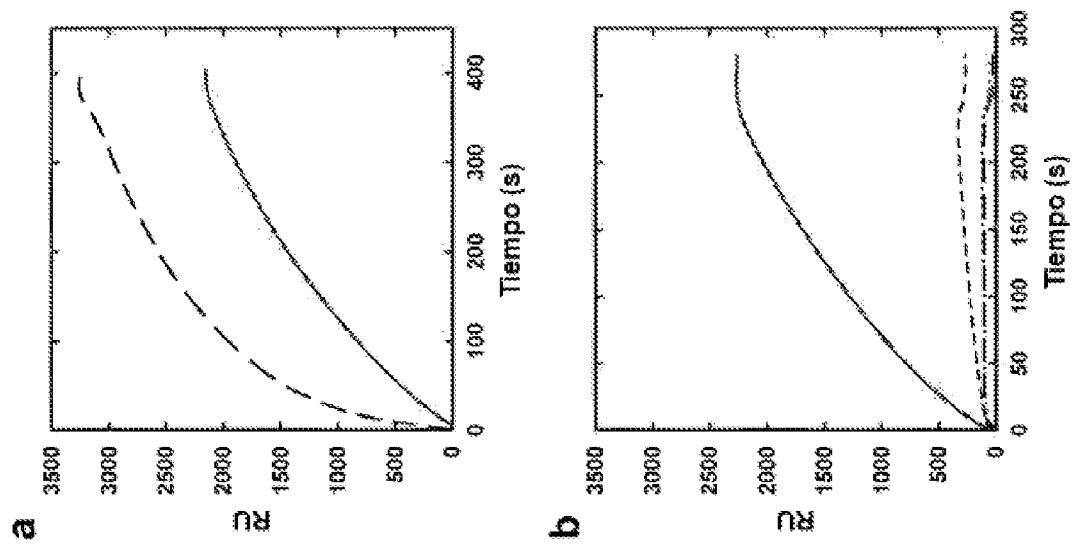


Figura 5

Figura 6