



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 410**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/285** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01986694 .6**

96 Fecha de presentación : **05.10.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1326887**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

54 Título: **Polipéptidos de *Haemophilus influenza*.**

30 Prioridad: **13.10.2000 GB 0025170**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.02.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.02.2010**

73 Titular/es: **Glaxosmithkline Biologicals**  
**Rue de l'Institut 89**  
**1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es: **Thonnard, Joelle**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 333 410 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

Polipéptidos de *Haemophilus influenzae*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a polinucleótidos (denominados en el presente documento “polinucleótido(s) BASB203”), a polipéptidos codificados por ellos (denominados en el presente documento “BASB203” o “polipéptido(s) BASB203”), a materiales recombinantes y a procedimientos para su producción. La invención se refiere a procedimientos para el uso de esos polipéptidos y polinucleótidos, incluyendo vacunas contra infecciones bacterianas.

**Antecedentes de la invención**

El *Haemophilus influenzae* es una bacteria gram-negativa no móvil. El hombre es su único hospedador natural.

Los *H. influenzae* aislados normalmente se clasifican según su cápsula polisacáridica. Se han identificado seis tipos capsulares diferentes designados de la a) a la f). Los aislados que no consiguen aglutinarse con antisuero crecido contra uno de estos seis serotipos se clasifican como no tipificables, y no expresan cápsula.

El *H. influenzae* tipo b es claramente diferente de los otros tipos ya que es la causa principal de la meningitis bacteriana y de enfermedades sistémicas. El *H. influenzae* no tipificable (NTHi) sólo se aísla ocasionalmente de la sangre de pacientes con una enfermedad sistémica.

El NTHi es una causa habitual de neumonía, exacerbación de bronquitis crónica, sinusitis y otitis media.

La otitis media es una enfermedad infantil importante tanto por el número de casos como por sus potenciales secuelas. Cada año se registran en Estados Unidos más de 3,5 millones de casos, y se estima que el 80% de los niños han experimentado, al menos, un episodio de otitis antes de alcanzar la edad de tres años (1). Si se deja sin tratar, o si se vuelve crónica, esta enfermedad puede dar lugar a pérdida de audición que puede ser temporal (en el caso de acumulación de fluidos en el oído medio) o permanente (si el nervio auditivo está dañado). En párvulos, esa pérdida de audición puede ser responsable del retraso en el aprendizaje del habla.

Tres especies bacterianas se aíslan principalmente del oído medio de niños con otitis media: *Streptococcus pneumoniae*, NTHi y *M. catarrhalis*. Éstas están presentes en un 60 a 90% de los casos. Una revisión de estudios recientes demuestran que la *S. pneumoniae*, y la NTHi representa cada una un 30% aproximadamente, y la *M. catarrhalis* un 15% aproximadamente de los casos de otitis media (2). Se pueden aislar otras bacterias del oído medio (*H. influenzae* tipo B, *S. pyogenes*,...) pero a una frecuencia mucho menor (2% de los casos o inferior).

Los datos epidemiológicos indican que, para los patógenos encontrados en el oído medio, la colonización del tracto respiratorio superior es un prerrequisito absoluto para el desarrollo de una otitis; no obstante también son necesarios otros factores para dar lugar a las enfermedades (3-9). Estos son importantes para desencadenar la migración de las bacterias hacia el oído medio a través de las trompas de Eustaquio, seguido por la iniciación de un proceso inflamatorio. Estos otros factores, a día de hoy, se desconocen. Se ha propuesto que, por ejemplo, una anomalía transitoria del sistema inmunitario después de una infección vírica podría provocar la incapacidad para controlar la colonización del tracto respiratorio (5). Una explicación alternativa es que la exposición a factores medioambientales permite una colonización más importante de algunos niños, que posteriormente se vuelven susceptibles al desarrollo de otitis media debido a la presencia mantenida de patógenos en el oído medio (2).

Se ha demostrado que diversas proteínas de *H. influenzae* están involucradas en la patogénesis o se ha demostrado que confieren protección después de la vacunación en modelos animales.

Se ha informado de la adherencia del NTHi a células epiteliales de la nasofaringe humana (10). Además de las fimbrias y los pili (11-15), se han identificado muchas adhesinas en NTHi. Entre ellas, dos proteínas de alto peso molecular expuestas en la superficie denominadas HMW1 y HMW2 han demostrado mediar en la adhesión de NTHi a células epiteliales (16). Otra familia de proteínas de alto peso molecular ha sido identificada en cepas de NTHi que carecen de proteínas que pertenezcan a la familia HMW1/HMW2. La proteína Hia de 115 kDa de NTHi (17) es muy similar a la adhesina Hsf expresada por cepas de *H. influenzae* de tipo b (18). Otra proteína, la proteína Hap muestra similitudes con las serinproteasas IgA1 y ha demostrado estar involucrada tanto en la adhesión como en la entrada a la célula (19).

Se han identificado y se han numerado cinco proteínas de la membrana exterior principales (OMP).

Los estudios originales usando cepas de *H. influenzae* tipo b demostraron que anticuerpos específicos para P1 y P2 protegían a ratas no adultas frente a exposiciones posteriores (20-21). Se encontró que la P2 es capaz de inducir anticuerpos bacterianos y opsonicos, que están dirigidos contra las regiones variables presentes en las estructuras en bucle expuestas sobre la superficie de esta OMP integral (22-23). La lipoproteína P4 también podía inducir anticuerpos bactericidas (24).

## ES 2 333 410 T3

La P6 es una lipoproteína asociada al péptidoglicano conservada que constituye el 1-5% de la membrana externa (25). Posteriormente se identificó una lipoproteína aproximadamente del mismo peso molecular, denominada PCP (proteína de reacción cruzada con P6) (26). Una mezcla de las lipoproteínas conservadas P4, P6 y PCP no reveló ninguna protección tal y como se mide en un modelo de otitis media en chinchilla (27). La P6 sola parece inducir protección en el modelo de chinchilla (28).

La P5 tiene una homología de secuencia con la OmpA integral de *Escherichia coli* (29-30). La P5 parece experimentar una deriva antigénica durante infecciones persistentes con NTHi (31). No obstante, regiones conservadas de esta proteína indujeron protección en el modelo de chinchilla de otitis media.

En línea con las observaciones realizadas con gonococos y meningococos, el NTHi expresa un receptor de transferrina humana dual compuesto de TbpA y TbpB cuando se crece con limitación de hierro. Ratas no adultas protegidas anti-TbpB. (32). También se han descrito para el NTHi receptores de hemoglobina/haptoglobina (33). También se ha identificado un receptor para Haem:Hemopexina (34). En el NTHi también está presente un receptor de lactoferrina, pero aún no se ha caracterizado (35).

Una OMP de 80 kDa, el antígeno de superficie D 15, proporciona protección frente a NTHi en un modelo de exposición en ratón. (36). Una lipoproteína de la membrana exterior de 42 kDa, la LPD, está conservada entre los *Haemophilus influenzae* e induce anticuerpos bactericidas (37). Se encontró que una OMP menor de 98 kDa (38), es un antígeno protector, esta OMP puede ser perfectamente una de las OMP inducibles por la limitación de Fe o de las adhesinas de elevado peso molecular que se han caracterizado. El *H. influenzae* produce la actividad proteasa IgA1 (39). Las proteasas IgA1 de NTHi presentan un alto grado de variabilidad antigénica (40). Otra OMP de NTHi, la OMP 26, una proteína de 26 kDa ha demostrado aumentar el aclaramiento pulmonar en un modelo de rata (41). La proteína HtrA de NTHi también ha demostrado ser un antígeno protector. De hecho, esta proteína ha protegido a la chinchilla frente a otitis media y ha protegido a ratas no adultas frente a bacteremia de *H. influenzae* de tipo b (42).

### Referencias de los antecedentes

1. Klein, JO (1994) *Clin. Inf. Dis* 19:823
2. Murphy, TF (1996) *Microbiol. Rev.* 60:267
3. Dickinson, DP y col. (1988) *J. Infect. Dis.* 158:205
4. Faden, HL y col. (1991) *Ann. Otorhinol. Laryngol.* 100:612
5. Faden, HL y col (1994) *J. Infect. Dis.* 169:1312
6. Leach, AJ y col. (1994) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13:983
7. Prellner, KP y col. (1984) *Acta Otolaryngol.* 98:343
8. Stenfors, L-E and Raisanen, S. (1992) *J. Infect. Dis.* 165:1148
9. Stenfors, L-E and Raisanen, S. (1994) *Acta Otolaryngol.* 113:191
10. Read, RC. y col. (1991) *J. Infect. Dis.* 163:549
11. Brinton, CC. y col. (1989) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8:S54
12. Kar, S. y col. (1990) *Infect. Immun.* 58:903
13. Gildorf, JR. y col. (1992) *Infect. Immun.* 60:374
14. St. Geme, JW y col. (1991) *Infect. Immun.* 59:3366
15. St. Geme, JW y col. (1993) *Infect. Immun.* 61: 2233
16. St. Geme, JW. y col. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2875
17. Barenkamp, SJ. et JW St Geme (1996) *Mol. Microbiol.* (In press)
18. St. Geme, JW. y col. (1996) *J. Bact.* 178:6281
19. St. Geme, JW. y col. (1994) *Mol. Microbiol.* 14:217
20. Loeb, MR. y col. (1987) *Infect. Immun.* 55:2612

## ES 2 333 410 T3

21. Musson, RS. Jr. y col. (1983) *J. Clin. Invest.* 72:677
22. Haase, EM. y col. (1994) *Infect. Immun.* 62:3712
- 5 23. Troelstra, A. y col. (1994) *Infect. Immun.* 62:779
24. Green, BA. y col. (1991) *Infect. Immun.* 59:3191
25. Nelson, MB. y col. (1991) *Infect. Immun.* 59:2658
- 10 26. Deich, RM. y col. (1990) *Infect. Immun.* 58:3388
27. Green, BA. y col. (1993) *Infect. Immun.* 61:1950
- 15 28. Demaria, TF. y col. (1996) *Infect. Immun.* 64:5187
29. Miyamoto, N., Bakaletz, LO (1996) *Microb. Pathog.* 21:343
30. Munson, RS.j.r. y col. (1993) *Infect. Immun.* 61:1017
- 20 31. Duim, B. y col. (1997) *Infect. Immun.* 65:1351
32. Loosmore, SM. y col. (1996) *Mol. Microbiol.* 19:575
- 25 33. Maciver, I. y col. (1996) *Infect. Immun.* 64:3703
34. Cope, LD. y col. (1994) *Mol. Microbiol.* 13:868
35. Schryvers, AB. y col. (1989) *J. Med. Microbiol.* 29:121
- 30 36. Flack, FS. y col. (1995) *Gene* 156:97
37. Akkoyunlu, M. y col. (1996) *Infect. Immun.* 64:4586
- 35 38. Kimura, A. y col. (1985) *Infect. Immun.* 47:253
39. Mulks, MH. et Shoberg, RJ (1994) *Meth. Enzymol.* 235:543
40. Lomholt, H. Alphen, Lv, Kilian, M. (1993) *Infect. Immun.* 61:4575
- 40 41. Kyd, J.M. and Cripps, A.W. (1998) *Infect. Immun.* 66:2272
42. Loosmore, S.M. y col. (1998) *Infect. Immun.* 66:899.

45 La frecuencia de infecciones por NTHi se ha incrementado drásticamente en las últimas décadas. Este fenómeno ha generado unas necesidades médicas no satisfechas de nuevos agentes antimicrobianos, vacunas, procedimientos de selección de fármacos y pruebas diagnósticas para este organismo. La presente invención tiene el objetivo de satisfacer esta necesidad.

### 50 **Resumen de la invención**

55 La presente invención se refiere a BASB203, en particular a polipéptidos BASB203 y polinucleótidos BASB203, a materiales recombinantes y a procedimientos para su producción. La invención se refiere a procedimientos para el uso de esos polipéptidos y polinucleótidos, incluyendo la prevención y tratamiento de enfermedades microbianas, entre otras. Describimos ensayos diagnósticos para la detección de enfermedades asociadas a infecciones microbianas y dolencias asociadas a esas infecciones, tales como ensayos para detectar la expresión o actividad de polinucleótidos o polipéptidos BASB203.

60 Diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y del ámbito de la invención divulgada serán fácilmente evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la lectura de las siguientes descripciones y de la lectura de otras partes de la presente exposición.

### 65 **Descripción de la invención**

Los polipéptidos y polinucleótidos BASB203 se describen con mayor detalle a continuación. En particular, la invención se refiere a composiciones que comprenden polipéptidos y polinucleótidos de BASB203 de *H. influenzae* no tipificable, que está relacionado por homología de la secuencia de aminoácidos al precursor SLP de la proteína de

## ES 2 333 410 T3

la membrana externa de *E. coli*. El polipéptido BASB203 tiene una secuencia señal característica de una lipoproteína, y así es probable que se encuentre expuesto en la superficie de la bacteria. Esta secuencia señal está localizada entre el residuo 1 y el residuo 21 del polipéptido BASB203.

5 La invención se refiere de manera especial a polinucleótidos BASB203 y polipéptidos codificados listados en la tabla A. Aquellos polinucleótidos y polipéptidos codificados tienen las secuencias de nucleótidos y aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 10 como se describe en la tabla A.

TABLA A

10

Cepa	aislada en	de	secuencia de nucleótidos	secuencia de péptidos
3224A o ATCC PTA-1816	EE.UU.	Otitis media	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
810956	NL	Meningitis	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
27W116791N 1	DK	Fibrosis cística	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
A860514	NL	Bronquitis crónica	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
A840164	NL	Cepa portadora	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10

35 Se entiende que las secuencias citadas de nuevo en el Listado de secuencias más abajo como “ADN” representan una ejemplificación de una secuencia de una forma de realización de la invención, puesto que aquellos con conocimientos ordinarios en la materia reconocerán que esas secuencias se pueden emplear de forma útil en polinucleótidos en general, incluyendo ribopolinucleótidos.

40 Las secuencias de los polinucleótidos BASB203 se establecen en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9. La SEQ del Grupo 1 se refiere en el presente documento a uno cualquiera de los polinucleótidos establecidos en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9.

45 Las secuencias de los polipéptidos codificados por BASB203 están establecidas en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10. La SEQ del Grupo 2 se refiere en el presente documento a uno cualquiera de los polipéptidos codificados establecidos en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10.

50 Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 90% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10, sobre la longitud completa de dicha secuencia, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Según un segundo aspecto de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprende un polipéptido aislado que comprende un fragmento inmunógeno de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10, en la que el fragmento inmunógeno (si fuera necesario, cuando se encuentra acoplado a un vehículo) es capaz de generar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 ó 10 respectivamente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 Según un tercer aspecto de la invención se proporciona una composición de vacuna que comprende un fragmento inmunógeno de un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10, en la que el fragmento inmunógeno (si fuera necesario, cuando se encuentra acoplado a un vehículo) es capaz de generar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 ó 10 respectivamente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65 Según un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprende una proteína de fusión que comprende el polipéptido o fragmento inmunógeno que se ha definido en cualquiera del primer, segundo o tercer aspecto de la presente invención.

## ES 2 333 410 T3

Según un quinto aspecto de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprende un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión que se ha definido en cualquiera del primer, segundo, tercer o cuarto aspecto de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5

Según un sexto aspecto de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprende un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 90% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10, sobre la longitud completa de dicha secuencia y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10

Según un séptimo aspecto de la invención se proporciona una composición de vacuna que comprende un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado del grupo constituido por las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10 que se puede obtener seleccionando una librería apropiada en condiciones de hibridación rigurosas con una sonda marcada que tiene la secuencia de ADN correspondiente de las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 ó 9 respectivamente o uno de sus fragmentos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15

Según un octavo aspecto de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprende una vesícula de la membrana externa de la bacteria que comprende el polipéptido, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión que se ha definido en cualquiera del primer, segundo, tercer o cuarto aspecto de la presente invención, que se puede obtener a partir de una célula hospedadora que comprende un vector de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido aislado que se ha definido en cualquiera del quinto, sexto o séptimo aspecto de la presente invención y una región aguas arriba modificada de dicho polinucleótido cuya región aguas arriba modificada contiene un elemento regulador heterólogo fuerte, en el que el polipéptido, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión se expresan sobre la membrana externa, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20

25

Según un noveno aspecto de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprende una vesícula de la membrana externa de la bacteria que comprende el polipéptido, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión que se ha definido en cualquiera del primer, segundo, tercer o cuarto aspecto de la presente invención, que se puede obtener a partir de una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que comprende el polinucleótido aislado que se ha definido en cualquiera del quinto, sexto o séptimo aspecto de la presente invención y una región aguas arriba modificada que dicho polinucleótido aislado cuya región aguas arriba modificada contiene un elemento regulador heterólogo fuerte, en el que el polipéptido, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión se expresan sobre la membrana externa, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

35

Según un décimo aspecto de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprende un vector de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido aislado que se ha definido en cualquiera del quinto, sexto o séptimo aspecto de la presente invención y una región aguas arriba modificada de dicho polinucleótido cuya región aguas arriba modificada contiene un elemento regulador heterólogo fuerte, una célula hospedadora que comprende dicho vector, o una fracción subcelular o una membrana de dicha célula hospedadora que expresa el polipéptido aislado, el fragmento inmunógeno, o la proteína de fusión como se ha definido en cualquiera del primer, segundo, tercer o cuarto aspecto de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40

La composición de vacuna además puede comprender uno o más de los siguientes grupos de antígenos:

45

- a) uno o más polisacáridos capsulares de pneumococo;
- b) uno o más antígenos que pueden proteger a un hospedador frente a una infección por *M. catarrhalis*;
- 50 c) uno o más antígenos de proteínas que pueden proteger a un hospedador frente a una infección por *Streptococcus pneumoniae*;
- d) uno o más antígenos de proteínas de *Haemophilus influenzae* no tipificables adicionales;
- 55 e) uno o más antígenos que pueden proteger a un hospedador frente a RSV;
- f) uno o más antígenos que pueden proteger a un hospedador frente al virus de la gripe.

55

El uno o más antígenos que pueden proteger a un hospedador frente a infección por *M. catarrhalis* se pueden seleccionar de una lista constituida por OMP106, OMP21, UspA1 y/o UspA2, OmpCD, D15 y Hly3.

60

El uno o más antígenos de proteínas que pueden proteger a un hospedador frente a infección por *Streptococcus pneumoniae* se pueden seleccionar de una lista constituida por: pneumolisina, PspC, PsaA y CbpA.

65

El uno o más antígenos de proteínas adicionales de *Haemophilus influenzae* no tipificable se pueden seleccionar de la lista constituida por: OMP26, P6, proteína D, Hia, Hsf, Hmw 1, Hmw2, Hmw3, Hmw4, Hap, D15, P2 y P5.

## ES 2 333 410 T3

Según un undécimo aspecto de la presente invención se proporciona el uso de una cantidad eficaz de un polipéptido aislado, un fragmento inmunógeno o una proteína de fusión que se ha definido en cualquiera del primer, segundo, tercer o cuarto aspecto de la presente invención, en la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria en un animal que da lugar a la prevención o el tratamiento de una infección.

Según un duodécimo aspecto de la presente invención se proporciona el uso de una cantidad eficaz de un polinucleótido aislado que se ha definido en cualquiera del quinto, sexto o séptimo aspecto de la presente invención en la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria en un animal que da lugar a la prevención o el tratamiento de una infección.

Según un decimotercer aspecto de la presente invención se proporciona el uso de (i) un vector de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido aislado que se ha definido en cualquiera del quinto, sexto séptimo aspecto de la presente invención y una región aguas arriba modificada de dicho polinucleótido cuya región aguas arriba modificada contiene un elemento regulador heterólogo fuerte, (ii) una célula hospedadora que comprende dicho vector, o (iii) una fracción subcelular o una membrana de dicha célula hospedadora que expresa un polipéptido aislado, un fragmento inmunógeno o una proteína de fusión que se ha definido en cualquiera del primero, segundo, tercero, o cuarto aspecto de la presente invención, o (iv) la vesícula de la membrana externa de la bacteria que se ha definido en el octavo o noveno aspecto de la presente invención, en la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria en un animal que da lugar a la prevención o el tratamiento de una infección.

Según un decimocuarto aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica útil en el tratamiento de humanos con una enfermedad por *H. influenzae* no tipificable que comprende al menos un anticuerpo dirigido contra un polipéptido aislado o un fragmento inmunógeno como se ha definido en uno cualquiera del primero, segundo o tercer aspecto de la presente invención y un vehículo farmacéutico adecuado, y en el que dicho anticuerpo es inmunoespecífico para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10.

Según un decimoquinto aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento para la fabricación de una composición de vacuna que comprende las etapas de preparación de células hospedadoras que comprenden un polinucleótido recombinante que comprende el polinucleótido aislado que se ha definido en cualquiera del quinto, sexto o séptimo aspecto de la presente invención que expresa un polipéptido recombinante que es el polipéptido aislado, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión que se ha definido en uno cualquiera del primer, segundo, tercer o cuarto aspecto de la presente invención, o una fracción subcelular o la membrana de dicha célula hospedadora que comprende el polipéptido recombinante, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión y la formulación de dicho polipéptido recombinante, fragmento inmunógeno o proteína de fusión con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

### *Polipéptidos*

La invención se refiere a composiciones que comprenden polipéptidos de *H. influenzae* no tipificables denominados en el presente documento "BASB203" y "polipéptidos BASB203" así como sus variantes biológica, diagnóstica, profiláctica, clínica o terapéuticamente útiles.

La composición puede comprender:

- (a) un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 90%, más preferentemente al menos una identidad del 95%, lo más preferentemente al menos una identidad del 97-99% o exacta, con la de cualquier secuencia de la SEQ del Grupo 2;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene una identidad exacta con cualquier secuencia de la SEQ del Grupo 1 sobre la longitud completa de la secuencia seleccionada de la SEQ del Grupo 1; o
- (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos una identidad del 90%, más preferentemente al menos una identidad del 95%, incluso más preferentemente al menos una identidad del 97-99% o exacta, con la secuencia de aminoácidos de cualquier secuencia de la SEQ del Grupo 2.

Los polipéptidos BASB203 proporcionados en la SEQ del Grupo 2 son los polipéptidos BASB203 de las cepas de *H. influenzae* no tipificables como se ha descrito en la tabla A.

La composición puede comprender un fragmento inmunógeno de un polipéptido BASB203, esto es, una porción contigua del polipéptido BASB203 que tiene la misma, o sustancialmente la misma, actividad inmunógena que el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos correspondiente seleccionada de la SEQ del Grupo 2; es decir, el fragmento (si fuera necesario, cuando se encuentra acoplado a un vehículo) es capaz de generar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido BASB203. Ese fragmento inmunógeno puede incluir, por ejemplo, el polipéptido

## ES 2 333 410 T3

BASB203 que carece de una secuencia líder N-terminal, y/o un dominio transmembrana y/o un dominio de anclaje C-terminal. En una forma de realización preferida el fragmento inmunógeno de BASB203 comprende sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido que tiene al menos una identidad del 90%, más preferentemente al menos una identidad del 95%, lo más preferentemente al menos una identidad del 97-99%, con la de una secuencia seleccionada de la SEQ del Grupo 2 sobre la longitud completa de dicha secuencia.

Un fragmento es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es enteramente igual como parte, pero no toda, de cualquier secuencia de aminoácidos de cualquier polipéptido útil en la invención. Como con los polipéptidos BASB203, los fragmentos pueden estar “libres”, o comprendidos dentro de un polipéptido más grande del cual forman una parte o región, lo más preferentemente como una única región continua en un solo polipéptido más grande.

Los fragmentos preferidos incluyen, por ejemplo, polipéptidos truncados que tienen una porción de una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ del Grupo 2 o de sus variantes, tal como una serie continua de residuos que incluye una secuencia de aminoácidos amino- y/o carboxi-terminal. También se prefieren las formas de degradación de los polipéptidos producidas por o en una célula hospedadora. Los fragmentos más preferidos están caracterizados por atributos estructurales o funcionales tales como fragmentos que comprenden  $\alpha$ -hélices y regiones que forman  $\alpha$ -hélices, láminas  $\beta$  y regiones que forman láminas  $\beta$ , giros y regiones que forman giros, cintas y regiones que forman cintas, regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones  $\alpha$ -anfipáticas, regiones  $\beta$ -anfipáticas, regiones flexibles, regiones que forman superficies, región de unión al sustrato, y regiones con un alto índice antigénico.

Fragmentos preferidos adicionales para su uso en la invención incluyen un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 15, 20, 30, 40, 50 ó 100 aminoácidos contiguos a partir de una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ del Grupo 2 o un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 15, 20, 30, 40, 50 ó 100 aminoácidos contiguos truncados o eliminados de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ del Grupo 2. Un fragmento preferido es un polipéptido BASB203 sin su secuencia señal (residuo 1 al residuo 21 del polipéptido BASB203).

Otros fragmentos preferidos adicionales son aquellos que comprenden un epítipo para linfocitos B o linfocitos T ayudantes, por ejemplo, aquellos fragmentos/péptidos descritos en el Ejemplo 13.

Los fragmentos de los polipéptidos útiles en la invención se pueden emplear para producir el polipéptido de longitud completa correspondiente mediante síntesis peptídica; por tanto, estos fragmentos se pueden emplear como intermedios para la producción de los polipéptidos de longitud completa útiles en la invención.

Variantes particularmente preferidas son aquellas en las que varios, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 ó 1 aminoácidos se sustituyen, eliminan, o añaden en cualquier combinación.

Los polipéptidos, o fragmentos inmunógenos, útiles en la invención pueden estar en forma de la proteína “madura” o pueden ser una parte de una proteína más grande tal como un precursor o una proteína de fusión. A menudo es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contenga secuencias secretoras o líderes, pro-secuencias, secuencias que ayudan en la purificación tales como múltiples residuos de histidina, o una secuencia adicional para la estabilidad durante la producción recombinante. Además, también se debe considerar la adición de un polipéptido exógeno o una cola lipídica o secuencias de polinucleótidos para incrementar la inmunogenicidad potencial de la molécula final.

En un aspecto, la invención se refiere a proteínas de fusión solubles modificadas genéticamente que comprenden un polipéptido útil en la presente invención, o uno de sus fragmentos, y diversas porciones de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de diversas subclases (IgG, IgM, IgA, IgE). Como inmunoglobulina preferida está la parte constante de la cadena pesada de la IgG humana, particularmente la IgG1, en la que la fusión tiene lugar en la región bisagra. En una forma de realización particular, la parte Fc se puede eliminar simplemente con la incorporación de una secuencia de escisión que se puede escindir con el factor de coagulación sanguíneo Xa.

Además, esta invención se refiere a procedimientos para la preparación de estas proteínas de fusión mediante ingeniería genética, y a su uso para la selección de fármacos, diagnóstico y terapia. La invención también se refiere a polinucleótidos que codifican esas proteínas de fusión. Ejemplos de tecnología para proteínas de fusión se pueden encontrar en las Solicitudes de patente internacional N° WO 94/29458 y WO 94/22914.

Las proteínas se pueden conjugar químicamente, o se pueden expresar en forma de proteínas de fusión recombinantes que permiten que se produzcan niveles incrementados en un sistema de expresión comparados con una proteína no fusionada. El compañero de fusión puede ayudar a proporcionar epítopos de linfocitos T ayudantes (compañero de fusión inmunológico), preferentemente epítopos de linfocitos T ayudantes reconocidos por seres humanos, o ayudar en la expresión de la proteína (potenciador de la expresión) con rendimientos más elevados que la proteína recombinante nativa. Preferentemente, el compañero de fusión será tanto un compañero de fusión inmunológico como un compañero que potencie la expresión.

Los compañeros de fusión incluyen la proteína D de *Haemophilus influenzae* y la proteína no estructural del virus de la gripe, NS 1 (hemaglutinina). Otro compañero de fusión es la proteína conocida como Omp26 (WO 97/01638).

## ES 2 333 410 T3

Otro compañero de fusión es la proteína conocida como LytA. Preferentemente se usa la porción C-terminal de la molécula. La LytA se deriva de *Streptococcus pneumoniae* que sintetiza una N-acetil-L-alanina amidasa, la amidasa LytA, (codificada por el gen *lytA* {Gene, 43 (1986) pág. 265-272}) una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces en el esqueleto de péptidoglicano. El dominio C-terminal de la proteína LytA es responsable de la afinidad por la colina o por algunos análogos de la colina tales como el DEAE. Esta propiedad se ha explotado para el desarrollo de plásmidos de expresión C-LytA en *E. coli* útiles para la expresión de proteínas de fusión. Se ha descrito la purificación de proteínas híbridas que contienen el fragmento C-LytA en su término amino {Biotechnology: 10, (1992) pág. 795-798}. Es posible usar la porción repetida de la molécula LytA encontrada en el extremo C-terminal que comienza en el residuo 178, por ejemplo, los residuos 188-305.

La presente invención también puede comprender polipéptidos que son variantes de los polipéptidos anteriormente mencionados, esto es, polipéptidos que varían de los referentes por sustituciones de aminoácidos conservativas, en las que un residuo es sustituido por otro con características similares. Esas sustituciones típicas se dan entre Ala, Val, Leu e Ile; entre Ser y Thr; entre los residuos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; y entre los residuos básicos Lys y Arg; o los residuos aromáticos Phe y Tyr.

Los polipéptidos útiles en la presente invención se pueden preparar de cualquier manera adecuada. Esos polipéptidos incluyen polipéptidos aislados de origen natural, polipéptidos producidos de manera recombinante, polipéptidos producidos sintéticamente, o polipéptidos producidos por una combinación de estos procedimientos. Los medios para la preparación de esos polipéptidos son muy conocidos en la materia.

Lo más preferido es que un polipéptido útil en la invención se derive de *H. influenzae* no tipificable, no obstante, preferentemente se puede obtener a partir de otros organismos del mismo género taxonómico. Un polipéptido útil en la invención también se puede obtener, por ejemplo, de organismos de la misma familia u orden taxonómico.

### *Polinucleótidos*

Es un objeto de la invención proporcionar composiciones que comprenden polinucleótidos que codifican polipéptidos BASB203, particularmente polinucleótidos que codifican los polipéptidos denominados en el presente documento BASB203.

En una forma de realización particularmente preferida de la invención, los polinucleótidos comprenden una región que codifica polipéptidos BASB203 que comprenden secuencias establecidas en la SEQ del Grupo 1 que incluye el gen de longitud completa, o una de sus variantes.

Los polinucleótidos BASB203 proporcionados en la SEQ del Grupo 1 son los polinucleótidos BASB203 de cepas de *H. influenzae* no tipificable como se ha descrito en la tabla A.

La invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican y/o expresan polipéptidos y polinucleótidos BASB203, particularmente polipéptidos y polinucleótidos BASB203 de *H. influenzae* no tipificable, incluyendo, por ejemplo, ARNs sin procesar, ARNs de ribozimas, ARNm, ADNc, ADN genómico, ADN B y Z. Formas de realización adicionales de la invención pueden incluir polinucleótidos y polipéptidos biológica, diagnóstica, profiláctica, clínica o terapéuticamente útiles, y sus variantes.

Los polinucleótidos aislados pueden incluir al menos un gen de longitud completa, que codifica un polipéptido BASB203 que tiene una secuencia de aminoácidos deducida de la SEQ del Grupo 2 y polinucleótidos íntimamente relacionados con ellos y sus variantes.

En otra forma de realización particularmente preferida de la invención se hace referencia a polipéptidos BASB203 de *H. influenzae* no tipificable que comprende o que consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEQ del Grupo 2 o una de sus variantes.

Usando la información proporcionada en el presente documento, tal como una secuencia de polinucleótidos establecida en la SEQ del Grupo 1, se puede obtener un polinucleótido útil en la invención que codifica polipéptidos BASB203 usando procedimientos de clonación y selección habituales, tales como aquellos para la clonación y secuenciación de fragmentos de ADN cromosómico a partir de bacterias usando como material de partida la cepa de células 3224A de *H. influenzae* no tipificable, seguido de la obtención de un clon de longitud completa. Por ejemplo, para obtener una secuencia de polinucleótidos útil en la invención, tal como una secuencia de polinucleótidos dada en la SEQ del Grupo 1, normalmente una librería de clones de ADN cromosómico de la cepa 3224A de *H. influenzae* no tipificable en *E. coli* o algún otro hospedador adecuado se investiga con una sonda con un oligonucleótido radiomarcado, preferentemente un 17-mero o más largo, derivado de una secuencia parcial. Los clones que llevan ADN idéntico al de la sonda se pueden distinguir entonces usando condiciones de hibridación rigurosas. Secuenciando los clones individuales identificados de esta forma mediante hibridación con cebadores de secuenciación diseñados a partir de la secuencia del polipéptido o polinucleótido original, es posible extender la secuencia del polinucleótido en ambas direcciones para determinar la secuencia de un gen de longitud completa. De manera conveniente, esa secuenciación se lleva a cabo, por ejemplo, usando ADN de doble cadena desnaturalizado preparado a partir del clon de un plásmido. Las técnicas adecuadas están descritas por Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook y col., MOLECULAR CLONING, A

## ES 2 333 410 T3

LABORATORY MANUAL, 2ª Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). (véase en particular Screening By Hybridization 1.90 y Sequencing Denatured Double-Stranded DNA Templates 13.70). También se puede llevar a cabo la secuenciación directa de ADN genómico para obtener una secuencia génica de longitud completa. Ejemplos ilustrativos de polinucleótidos útiles en la invención son polinucleótidos establecidos en la SEQ del Grupo 1 que se descubrieron en una librería de ADN derivada de *H. influenzae* no tipificable.

Además, cada secuencia de ADN establecida en la SEQ del Grupo 1 contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína que tiene aproximadamente el número de residuos aminoácidos expuestos en la SEQ del Grupo 2, con un peso molecular deducido que se puede calcular usando los valores del peso molecular de los residuos aminoácidos muy conocidos por aquellos expertos en la materia.

Los polinucleótidos de la SEQ del Grupo 1, entre el codón de iniciación y el codón de detención, codifican respectivamente los polipéptidos de la SEQ del Grupo 2. El número de nucleótidos del codón de iniciación y el primer nucleótido del codón de detención se listan en la tabla B para cada polinucleótido de la SEQ del Grupo 1.

TABLA B

Secuencia de nucleótidos	Secuencia peptídica codificada	Codón de iniciación	1er nucleótido del codón de detección
SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	1	547
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	1	544 *
SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	1	550
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	1	547
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	1	550

\* primer nucleótido del último codón de la secuencia codificante parcial

El polinucleótido aislado puede comprender o constar de:

- (a) una secuencia de polinucleótidos que tiene una identidad exacta, con una secuencia de polinucleótidos de la SEQ del Grupo 1 sobre la longitud completa de la secuencia de polinucleótidos de la SEQ del Grupo 1; o
- (b) una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos una identidad del 90%, más preferentemente al menos una identidad del 95%, incluso más preferentemente al menos una identidad del 97-99% o una identidad exacta del 100%, con cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ del Grupo 2, sobre la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de la SEQ del Grupo 2.

Se puede obtener un polinucleótido que codifica un polipéptido útil en la presente invención, incluyendo homólogos y ortólogos de especies distintas a *H. influenzae* no tipificable, mediante un procedimiento que comprende las etapas de selección de una librería apropiada en condiciones de hibridación rigurosas (por ejemplo, usando una temperatura en el intervalo de 45-65°C y una concentración de SDS del 0,1-1%) con una sonda marcada o detectable que consta de o comprende cualquier secuencia seleccionada entre la SEQ del Grupo 1 o uno de sus fragmentos; y el aislamiento de un gen de longitud completa y/o clones genómicos que contienen dicha secuencia de polinucleótidos.

La secuencia de polinucleótidos puede ser idéntica a lo largo de su longitud completa a una secuencia codificante (marco de lectura abierto) establecido en la SEQ del Grupo 1. Además, la secuencia de polinucleótidos puede ser una secuencia codificante para un polipéptido maduro o para uno de sus fragmentos, por sí misma así como una secuencia codificante para un polipéptido maduro o un fragmento en un marco de lectura con otras secuencias codificantes, tal como una secuencia que codifica una secuencia líder o secretora, una secuencia de una pre-, o pro-, o prepro-proteína. El polinucleótido útil en la invención también puede contener al menos una secuencia no codificante, incluyendo por ejemplo, pero no limitado a, al menos una secuencia 5' y 3' no codificante, tales como secuencias transcritas pero no traducidas, señales de terminación (tales como señales de terminación dependientes de rho e independientes de rho), sitios de unión a ribosomas, secuencias de Kozak, secuencias que estabilizan el ARNm, intrones, y señales de poliadenilación. La secuencia de polinucleótidos también puede comprender secuencias codificantes adicionales que codifican aminoácidos adicionales. Por ejemplo, puede estar codificada una secuencia marcadora que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En una secuencia de ciertas formas de realización de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexa-histidina, como se proporciona en el vector pQE (Qiagen, Inc.) y como se describe en Gentz y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86: 821-824 (1989), o una marca peptídica HA (Wilson y col., Cell 37: 767 (1984), ambas que pueden ser útiles en la purificación de una secuencia de polipéptidos fusionada a ellas. Los

## ES 2 333 410 T3

polinucleótidos útiles en la invención también incluyen, pero no están limitados a, polinucleótidos que comprenden un gen estructural y sus secuencias asociadas de manera natural que controlan la expresión del gen. La secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido BASB203 de la SEQ del Grupo 2 puede ser idéntica a la secuencia que codifica el polinucleótido correspondiente de la SEQ del Grupo 1. La posición del primer y del último nucleótido de las secuencias codificantes de la SEQ del Grupo 1 se listan en la tabla C. Alternativamente puede ser cualquier secuencia, que como resultado de la redundancia (degeneración) del código genético, también codifica un polipéptido de la SEQ del Grupo 2.

TABLA C

Secuencia de nucleótidos	Secuencia peptídica codificada	Codón de iniciación	Último nucleótido de la secuencia codificante
SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	1	546
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	1	544*
SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	1	549
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	1	546
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	1	549

\* último nucleótido de la secuencia codificante parcial

La expresión “polinucleótido que codifica un polipéptido” como se usa en el presente documento engloba polinucleótidos que incluyen una secuencia que codifica un polipéptido útil en la invención, particularmente un polipéptido bacteriano y más particularmente un polipéptido del BASB203 de *H. influenzae* no tipificable que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las secuencias de la SEQ del Grupo 2. El término también engloba polinucleótidos que incluyen una sola región continua o regiones discontinuas que codifican el polipéptido (por ejemplo, polinucleótidos interrumpidos por fagos integrados, una secuencia de inserción integrada, una secuencia de un vector integrado, una secuencia de un trasposón integrado, o debido a la edición del ARN o a la reorganización del ADN genómico) junto con regiones adicionales, que también pueden contener secuencias codificantes y/o no codificantes.

La invención además se refiere a variantes de los polinucleótidos descritos en el presente documento que codifican variantes de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos deducida de cualquiera de las secuencias de la SEQ del Grupo 2. Se pueden usar fragmentos de polinucleótidos útiles en la invención, por ejemplo, para sintetizar polinucleótidos de longitud completa útiles en la invención.

Los fragmentos preferidos son aquellos polinucleótidos que codifican un epítipo para linfocitos B o linfocitos T ayudantes, por ejemplo, los fragmentos/péptidos descritos en el Ejemplo 13, y genes quiméricos recombinantes que comprenden dichos fragmentos de polinucleótidos.

Formas de realización adicionales particularmente preferidas pueden comprender polinucleótidos que codifican variantes de BASB203, que tienen la secuencia de aminoácidos del polipéptido BASB203 de cualquier secuencia de la SEQ del Grupo 2 en la que varios, unos pocos, de 5 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2, 1 o ningún residuo aminoácido son sustituidos, modificados, eliminados y/o añadidos, en cualquier combinación. Especialmente preferidas entre éstas son las sustituciones, adiciones y deleciones silenciosas, que no alteran las propiedades y actividades del polipéptido BASB203.

Formas de realización preferidas adicionales de la invención pueden comprender polinucleótidos que son al menos un 90% idénticos sobre su longitud completa a un polinucleótido que codifica un polipéptido BASB203 que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las secuencias de la SEQ del Grupo 2, y polinucleótidos que son complementarios a esos polinucleótidos. Alternativamente, lo más preferido son polinucleótidos que comprenden una región que es al menos un 90% idéntica sobre su longitud completa a un polinucleótido que codifica el polipéptido BASB203 y polinucleótidos complementarios a él. En este aspecto, son particularmente preferidos polinucleótidos al menos un 95% idénticos al mismo sobre su longitud completa. Además, aquellos con al menos un 97% son muy preferidos entre aquellos con al menos un 95%, y entre éstos, aquellos con al menos un 98% y al menos un 99% son muy particularmente preferidos, siendo lo más preferido al menos un 99%.

Formas de realización preferidas pueden comprender polinucleótidos que codifican polipéptidos que retienen sustancialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido maduro codificado por una secuencia de ADN seleccionada entre la SEQ del Grupo 1.

## ES 2 333 410 T3

De acuerdo con ciertas formas de realización preferidas de la invención se proporcionan polinucleótidos que se hibridan, particularmente en condiciones rigurosas, a secuencias de polinucleótidos BASB203, tales como aquellos polinucleótidos de la SEQ del Grupo 1.

5 La invención además se refiere a polinucleótidos que se hibridan a las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento. En este aspecto, la invención se refiere especialmente a polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas a polinucleótidos descritos en el presente documento. Como se usan en el presente documento, los términos “condiciones rigurosas” y “condiciones de hibridación rigurosas” quieren decir que la hibridación se produce sólo si hay al menos una identidad del 95% y preferentemente al menos una identidad del 97% entre las  
10 secuencias. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación rigurosas es la incubación durante toda la noche a 42°C en una disolución que comprende: 50% de formamida, 5x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 158 M), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x disolución de Denhardt, 10% de dextranosulfato, y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, seguido por el lavado del soporte de hibridación en 0,1x SSC a 65°C aproximadamente.

15 Las condiciones de hibridación y lavado son muy conocidas y se ejemplifican en Sambrook, y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), particularmente en su capítulo 11. También se puede usar la hibridación en disolución con las secuencias de polinucleótidos útiles en la invención.

20 La invención también puede comprender un polinucleótido que consta de o que comprende una secuencia de polinucleótidos obtenida mediante la selección de una librería apropiada que contiene el gen completo para una secuencia de polinucleótidos expuesta en cualquiera de las secuencias de la SEQ del Grupo 1 en condiciones de hibridación rigurosas con una sonda que tiene la secuencia de dicha secuencia de polinucleótidos expuesta en la secuencia correspondiente de la SEQ del Grupo 1 o uno de sus fragmentos; y el aislamiento de dicha secuencia de polinucleótidos.  
25 Los fragmentos útiles para la obtención de ese polinucleótido incluyen, por ejemplo, sondas y cebadores ampliamente descritos en otras partes del presente documento.

Como se ha descrito en otras partes del presente documento en lo que respecta a ensayos con polinucleótidos, por ejemplo, los polinucleótidos útiles en la invención, se pueden usar como sondas de hibridación para ARN, ADNc y  
30 ADN genómico para aislar ADNc de longitud completa y clones genómicos que codifican BASB203 y para aislar ADNc y clones genómicos de otros genes que presentan una elevada identidad, particularmente una elevada identidad de secuencia, con el gen BASB203. Esas sondas generalmente comprenderán al menos 15 residuos nucleótidos o pares de bases. Preferentemente, esas sondas tendrán al menos 30 residuos nucleótidos o pares de bases y pueden tener al menos 50 residuos nucleótidos o pares de bases. Las sondas particularmente preferidas tendrán al menos 20 residuos  
35 nucleótidos o pares de bases y tendrán menos de 30 residuos nucleótidos o pares de bases.

Una región codificante de un gen BASB203 se puede aislar por selección usando una secuencia de ADN proporcionada en la SEQ del Grupo 1 para sintetizar una sonda de oligonucleótidos. A continuación se usa un oligonucleótido marcado que tiene una secuencia complementaria a la de un gen útil en la invención para seleccionar una librería de  
40 ADNc, ADN genómico o ARNm para determinar a qué miembros de la librería se hibrida la sonda.

Existen varios procedimientos disponibles y muy conocidos por aquellos expertos en la materia para obtener ADNs de longitud completa, o ADNs cortos extendidos, por ejemplo, aquellos basados en los procedimientos de Amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE) (véase, por ejemplo, Frohman, y col., PNAS USA 85: 8998-9002,  
45 1988). Modificaciones recientes de la técnica, ejemplificadas por la tecnología de Marathon™ (Clontech Laboratories Inc.), por ejemplo, han simplificado significativamente la búsqueda de ADNc más largos. En la tecnología de Marathon™, se preparan ADNc a partir de ARNm extraído de un tejido seleccionado y se liga a cada extremo una secuencia “adaptadora”. A continuación se lleva a cabo la amplificación de los ácidos nucleicos (PCR) para amplificar el extremo 5’ “que falta” del ADN usando una combinación de cebadores de oligonucleótidos específicos del gen y  
50 específicos del adaptador. A continuación se repite la reacción PCR usando cebadores “anidados”, esto es, cebadores diseñados para hibridarse al producto amplificado (normalmente un cebador específico del adaptador que se hibrida más allá de 3’ en la secuencia adaptadora y un cebador específico del gen que se hibrida más allá de 5’ en la secuencia del gen seleccionado). A continuación los productos de esta reacción se pueden analizar por secuenciación del ADN y se puede construir un ADN de longitud completa uniendo directamente el producto al ADN existente para dar una  
55 secuencia completa, o llevando a cabo una PCR de longitud completa separada usando la nueva información de la secuencia para el diseño del cebador 5’.

Los polinucleótidos y polipéptidos útiles en la invención se pueden emplear, por ejemplo, como reactivos y materiales de investigación para el descubrimiento de tratamientos y diagnóstico de enfermedades, particularmente en  
60 enfermedades humanas, como se describe en profundidad en el presente documento en relación a ensayos con polinucleótidos.

Los polinucleótidos que son oligonucleótidos derivados de una secuencia de la SEQ del Grupo 1 se pueden usar como se ha descrito en los procedimientos del presente documento, pero preferentemente se usan para la PCR, para  
65 determinar si los polinucleótidos identificados en el presente documento se transcriben, o no, completamente o en parte, en bacterias en tejido infectado. Se reconoce que esas secuencias también tendrán utilidad en el diagnóstico de la fase de infección y del tipo de infección que ha alcanzado el patógeno.

## ES 2 333 410 T3

La invención también puede comprender polinucleótidos que codifican un polipéptido que es la proteína madura más aminoácidos amino o carboxilo-terminales adicionales, o aminoácidos interiores al polipéptido maduro (cuando la forma madura tiene más de una cadena polipeptídica, por ejemplo). Esas secuencias pueden desempeñar un papel en el procesamiento de una proteína a partir de un precursor hasta una forma madura, pueden permitir el transporte de la proteína, pueden alargar o acortar la semi-vida de la proteína o pueden facilitar la manipulación de la proteína para un ensayo o su producción, entre otras cosas. Como es el caso, en general, *in vivo*, los aminoácidos adicionales se pueden procesar aparte de la proteína madura por enzimas celulares.

Para todos y cada uno de los polinucleótidos útiles en la invención se proporciona un polinucleótido complementario a él. Se prefiere que estos polinucleótidos complementarios sean completamente complementarios a cada polinucleótido con el que son complementarios.

Una proteína precursora, que tiene una forma madura del polipéptido fusionado a una o más prosequencias puede ser una forma inactiva del polipéptido. Cuando las prosequencias se eliminan, generalmente esos precursores inactivos se activan. Algunas o todas las prosequencias se pueden eliminar antes de la activación. Generalmente, esos precursores se denominan proproteínas.

Además de las representaciones normalizadas A, G, C, T/U para los nucleótidos, también se puede usar el término "N" en la descripción de ciertos polinucleótidos útiles en la invención. "N" significa que en esa posición designada puede aparecer cualquiera de los cuatro nucleótidos de ADN o ARN en la secuencia de ADN o ARN, excepto que se prefiere que N no sea un ácido nucleico que cuando se toma en combinación con posiciones de nucleótidos adyacentes, cuando se lee en el marco de lectura correcto, tiene el efecto de generar un codón de terminación prematuro en ese marco de lectura.

En suma, un polinucleótido útil en la invención puede codificar una proteína madura, una proteína madura más una secuencia líder (a la que se puede denominar preproteína), un precursor de una proteína madura que tenga una o más prosequencias que no son las secuencias líder de una preproteína, o una preproteína, que es una precursora de una proproteína, que tiene una secuencia líder y una o más prosequencias, que generalmente se eliminan durante las etapas de procesamiento que producen formas activas y maduras del polipéptido.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona el uso de un polinucleótido descrito en el presente documento en la preparación de un medicamento para fines terapéuticos o profilácticos, en particular para la inmunización genética.

El uso de un polipéptido en inmunización genética preferentemente empleará un procedimiento de administración adecuado, tal como inyección directa de ADN plasmídico en los músculos (Wolff y col., *Hum Mol Genet* (1992) 1: 363, Manthorpe y col., *Hum. Gene Ther.* (1983) 4: 419), administración de ADN complejado con portadores de proteínas específicos (Wu y col., *J Biol Chem.* (1989) 264: 16985), coprecipitación de ADN con fosfato de calcio (Benvenisty & Reshef, *PNAS USA*, (1986) 83: 9551), encapsulación de ADN en diversas formas de liposomas (Kaneda y col., *Science* (1989) 243: 375), bombardeo de partículas (Tang y col., *Nature* (1992) 356:152, Eisenbraun y col., *DNA Cell Biol* (1993) 12: 791) e infección *in vivo* usando vectores retrovirales clonados (Seeger y col., *PNAS USA* (1984) 81: 5849).

### 45 *Vectores, células hospedadoras, sistemas de expresión*

Describimos vectores que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos útiles en la invención, células hospedadoras que están manipuladas genéticamente con vectores y la producción de polipéptidos útiles en la invención mediante técnicas recombinantes. También se pueden emplear sistemas de traducción libres de células para producir esas proteínas usando ARNs derivados de las construcciones de ADN útiles en la invención.

Los polipéptidos recombinantes útiles en la presente invención se pueden preparar mediante procedimientos muy conocidos por aquellos expertos en la materia, a partir de células hospedadoras manipuladas genéticamente que comprenden sistemas de expresión. Por consiguiente, describimos sistemas de expresión que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos útiles en la presente invención, células hospedadoras que están modificadas genéticamente con esos sistemas de expresión, y la producción de polipéptidos útiles en la invención mediante técnicas recombinantes.

Para la producción recombinante de los polipéptidos útiles en la invención, las células hospedadoras se pueden manipular genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos o polinucleótidos útiles en la invención. La introducción de un polinucleótido en la célula hospedadora se puede llevar a cabo mediante procedimientos descritos en muchos manuales de laboratorio de referencia, tales como Davis, y col., *BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, (1986) y Sambrook, y col., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), tales como, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada con DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada con lípidos catiónicos, electroporación, conjugación, transducción, carga por raspado, introducción balística e infección.

## ES 2 333 410 T3

Ejemplos representativos de hospedadores apropiados incluyen células bacterianas tales como células de estreptococos, estafilococos, enterococos, *E. coli*, *Streptomyces*, cianobacterias, *Bacillus subtilis*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*; células de hongos, tales como células de una levadura, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Pichia*, un basidiomiceto, *Candida albicans* y *Aspergillus*; células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV-1 y células de melanoma de Bowes; y células de plantas, tales como células de una gimnosperma o angiosperma.

Para producir los polipéptidos útiles en la invención se pueden usar una gran variedad de sistemas de expresión. Esos vectores incluyen, entre otros, vectores derivados de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de trasposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, papovavirus, tal como SV40, virus de la viruela, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus pseudorrábicos, picomavirus, retrovirus, y alfavirus y vectores derivados de sus combinaciones, tales como aquellos derivados de plásmidos y elementos genéticos de bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos. Las construcciones de sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulan y generan la expresión. Generalmente, para la expresión en este sentido se puede usar cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o expresar un polipéptido en un hospedador. La secuencia de ADN apropiada se puede insertar en el sistema de expresión con cualquiera de una variedad de técnicas rutinarias y muy conocidas, tales como, por ejemplo, aquellas expuestas en Sambrook y col., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, (*supra*).

En sistemas de expresión recombinantes en eucariotas, para la secreción de una proteína traducida al lumen del retículo endoplasmático, al espacio periplasmático o al entorno extracelular, se pueden incorporar señales de secreción apropiadas en el polipéptido expresado. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

Los polipéptidos útiles en la presente invención se pueden recuperar y purificar de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos muy conocidos, incluyendo precipitación en sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Más preferentemente, para la purificación se emplea cromatografía de afinidad con iones metálicos (IMAC). Para regenerar las conformaciones activas se pueden emplear técnicas muy conocidas para el replegamiento de proteínas cuando el polipéptido se desnaturaliza durante la síntesis intracelular, aislamiento y/o purificación.

El sistema de expresión también puede ser un microorganismo vivo recombinante, tal como un virus o una bacteria. El gen de interés se puede insertar en el genoma de un virus o bacteria recombinante vivo. La inoculación e infección *in vivo* con este vector dará lugar a la expresión *in vivo* del antígeno y la inducción de respuestas inmunitarias. Los virus y bacterias usados para este propósito son, por ejemplo: virus de la viruela (por ejemplo; vacuna de la viruela, de la viruela aviar, de la viruela de canario), alfa virus (virus de Sindbis, virus del bosque Semliki, virus de la encefalitis equina de Venezuela), adenovirus, virus asociados a adenovirus, picornavirus (poliovirus, rinovirus), herpesvirus (virus de la varicela zoster virus, etc), *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, BCG, estreptococos. Estos virus y bacterias pueden ser virulentos, o estar atenuados de diversas formas para obtener vacunas vivas. Esas vacunas vivas también forman parte de la invención.

### 45 *Diagnóstico, pronóstico, serotipado y ensayos de mutación*

Describimos el uso de polinucleótidos y polipéptidos BASB203 para su uso como reactivos diagnósticos. La detección de polinucleótidos y/o polipéptidos BASB203 en una eucariota, particularmente un mamífero, y especialmente un ser humano, proporcionará un procedimiento diagnóstico para el diagnóstico de enfermedades, estadio de enfermedades o respuesta de un organismo infeccioso a fármacos. Los eucariotas, particularmente mamíferos, y especialmente seres humanos, particularmente aquellos infectados o sospechosos de estar infectados con un organismo que comprende el gen o la proteína BASB203, se pueden detectar a nivel del ácido nucleico o de los aminoácidos con una variedad de técnicas muy conocidas, así como mediante los procedimientos proporcionados en el presente documento.

Los polipéptidos y polinucleótidos para la prognosis, diagnosis u otros análisis se pueden obtener a partir de materiales del cuerpo del individuo infectado y/o putativamente infectado. Los polinucleótidos procedentes de cualquiera de estas fuentes, particularmente del ADN o del ARN, se pueden usar directamente para la detección o se pueden amplificar enzimáticamente mediante el uso de la PCR o cualquier otra técnica de amplificación antes del análisis. El ARN, particularmente el ARNm, el ADNc y el ADN genómico también se pueden usar de formas similares. Usando la amplificación, se puede realizar la caracterización de las especies o cepas del organismo infeccioso o residente presente en un individuo, mediante un análisis del genotipo de un polinucleótido seleccionado del organismo. Las deleciones e inserciones se pueden detectar por un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo de una secuencia de referencia seleccionada en un organismo relacionado, preferentemente una especie diferente del mismo género o una cepa diferente de la misma especie. Las mutaciones puntuales se pueden identificar hibridando ADN amplificado a secuencias de polinucleótidos BASB203 marcadas. Las secuencias perfecta o significativamente emparejadas se pueden distinguir de dúplex imperfecta o más significativamente desemparejadas por digestión con DNasa o RNasa, para el ADN o el ARN respectivamente, o detectando diferencias de las temperaturas de fusión o

las cinéticas de renaturalización. También se pueden detectar diferencias en la secuencia de polinucleótidos por alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos de polinucleótidos en geles comparada con una secuencia de referencia. Esto se puede llevar a cabo con o sin agentes desnaturalizantes. También se pueden detectar diferencias en los polinucleótidos por secuenciación directa de ADN o ARN. Véase, por ejemplo, Myers y col., Science, 230: 1242 (1985). También se pueden revelar cambios de secuencia en localizaciones específicas mediante ensayos de protección contra nucleasas, tales como RNasa, ensayo de protección V1 y S1 o un procedimiento de escisión química. Véase, por ejemplo, Cotton y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 4397-4401 (1985).

Describimos que se puede construir un biochip de sondas de oligonucleótidos que comprenden la secuencia de nucleótidos BASB203 o de sus fragmentos para realizar una selección eficiente de, por ejemplo, mutaciones genéticas, serotipo, clasificación taxonómica o identificación. Los procedimientos con tecnología de biochips son muy conocidos y tienen una aplicabilidad general y se pueden usar para abordar una variedad de cuestiones en genética molecular incluyendo la expresión de genes, la unión genética, y la variabilidad genética (véase, por ejemplo, Chee y col., Science, 274: 610 (1996)).

Describimos un kit diagnóstico que comprende:

- (a) un polinucleótido útil en la presente invención, preferentemente cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la SEQ del Grupo 1, o uno de sus fragmentos;
- (b) una secuencia de nucleótidos complementaria a la de (a);
- (c) un polipéptido útil en la presente invención, preferentemente cualquiera de los polipéptidos de la SEQ del Grupo 2 o uno de sus fragmentos;
- (d) un anticuerpo para un polipéptido útil en la presente invención, preferentemente para cualquiera de los polipéptidos de la SEQ del Grupo 2.

Se apreciará que en ese kit, (a), (b), (c) o (d) puede comprender un componente sustancial. Ese kit se usará en el diagnóstico de una enfermedad o susceptibilidad a una enfermedad, entre otras.

Describimos el uso de polinucleótidos útiles en la presente invención como reactivos diagnósticos. La detección de una forma mutada de un polinucleótido útil en la invención, preferentemente cualquier secuencia de la SEQ del Grupo 1, que esté asociada a una enfermedad o patogenicidad proporcionará una herramienta diagnóstica que puede añadir, o definir, el diagnóstico de una enfermedad, el pronóstico del transcurso de una enfermedad, la determinación de una fase de una enfermedad, o la susceptibilidad a una enfermedad, que resulta de la sub-expresión, sobre-expresión o expresión alterada del polinucleótido. Se pueden detectar organismos, particularmente organismos infecciosos, que portan mutaciones en ese polinucleótido a nivel del polinucleótido mediante una variedad de técnicas, tales como aquellas descritas en otras partes del presente documento.

También se pueden detectar a nivel del polinucleótido o del polipéptido mediante una variedad de técnicas células de un organismo que portan mutaciones o polimorfismos (variaciones alélicas) en un polinucleótido y/o polipéptido útil en la invención, para permitir, por ejemplo, el serotipado. Por ejemplo, se puede usar RT-PCR para detectar mutaciones en el ARN. Particularmente se prefiere el uso de RT-PCR junto con sistemas de detección automatizados, tales como, por ejemplo, GeneScan. También se puede usar ARN, ADNc o ADN genómico con el mismo propósito, la PCR. Como ejemplo, para identificar y analizar mutaciones se pueden usar cebadores de PCR complementarios a un polinucleótido que codifica el polipéptido BASB203.

Describimos cebadores con 1, 2, 3 ó 4 nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3'. Estos cebadores se pueden usar, entre otras cosas, para amplificar ADN y/o ARN de BASB203 aislado de una muestra derivada de un individuo, tal como un material corporal. Los cebadores se pueden usar para amplificar un polinucleótido aislado de un individuo infectado, tal que el polinucleótido se puede someter a continuación a diversas técnicas para la elucidación de la secuencia de polinucleótidos. De esta forma, se pueden detectar mutaciones en la secuencia de polinucleótidos y se pueden usar para diagnosticar y/o pronosticar la infección o su fase o evolución, o para serotipar y/o clasificar el agente infeccioso.

Describimos un procedimiento por diagnosticar una enfermedad, preferentemente infecciones bacterianas, más preferentemente infecciones causadas por *H. influenzae* no tipificable, que comprende la determinación a partir de una muestra derivada de un individuo, tal como un material corporal, un nivel incrementado de expresión del polinucleótido que tiene una secuencia de cualquiera de las secuencias de la SEQ del Grupo 1. La expresión incrementada o reducida del polinucleótido BASB203 se puede medir usando uno cualquiera de los procedimientos muy conocidos en la materia para la cuantificación de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, amplificación, PCR, RT-PCR, protección frente a RNasa, transferencia de Northern, espectrometría y otros procedimientos de hibridación.

Además, describimos que se puede usar un ensayo diagnóstico para la detección de la sobre-expresión de polipéptido BASB203 comparada con muestras de tejido control normales para detectar la presencia de una infección, por ejemplo. Las técnicas de ensayo que se pueden usar para determinar los niveles de polipéptido BASB203, en una

## ES 2 333 410 T3

muestra derivada de un hospedador, tal como un material corporal, son muy conocidas por aquellos expertos en la materia. Esos procedimientos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitivos, análisis de transferencia de Western, ensayos de sándwich con anticuerpos, ensayos de detección de anticuerpos y ELISA.

5 Los polinucleótidos útiles en la invención también se pueden usar como componentes de biochips de polinucleótidos, preferentemente biochips o redes de alta densidad. Estos biochips de alta densidad son particularmente útiles con fines diagnósticos y pronósticos. Por ejemplo, se puede usar un grupo de manchas, cada una que comprende un gen diferente, y que adicionalmente comprende un polinucleótido o polinucleótidos útiles en la invención, para ensayos con sondas, tales como el uso de hibridación o amplificación de ácidos nucleicos, usando una sonda obtenida o  
10 derivada de una muestra corporal, para determinar la presencia de una secuencia de polinucleótidos particular o una secuencia relacionada en un individuo. Esa presencia puede indicar la presencia de un patógeno, particularmente *H. influenzae* no tipificable, y puede ser útil en el diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad o de la evolución de una enfermedad. Se prefiere una red que comprenda una serie de variantes de cualquier secuencia de polinucleótidos de la SEQ del Grupo 1. También se prefiere una serie de variantes de una secuencia de polinucleótidos que codifica  
15 cualquier secuencia de polipéptidos de la SEQ del Grupo 2.

### *Anticuerpos*

20 Se pueden usar como inmunógenos polipéptidos y polinucleótidos útiles en la invención o sus variantes, o células que los expresan, para producir anticuerpos inmuno-específicos para esos polipéptidos o polinucleótidos, respectivamente. Alternativamente, también se pueden usar como inmunógenos mimótopos, particularmente mimótopos peptídicos, de epítomos dentro de la secuencia de polipéptidos, para producir anticuerpos inmuno-específicos para el polipéptido útil en la invención. El término "inmuno-específico" significa que los anticuerpos presentan sustancialmente mayor afinidad por los polipéptidos útiles en la invención que su afinidad por otros polipéptidos relacionados de la técnica anterior.

En ciertas formas de realización preferidas de la invención, se proporcionan anticuerpos frente a polipéptidos y polinucleótidos BASB203.

30 Los anticuerpos generados contra los polipéptidos o polinucleótidos útiles en la invención se pueden obtener administrando los polipéptidos y/o polinucleótidos, o fragmentos que portan un epítomo de cualquiera de los dos o de ambos, análogos de cualquiera de los dos o de ambos, o células que expresan cualquiera de los dos o ambos, a un animal, preferentemente no humano, usando protocolos rutinarios. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica conocida en la materia que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos de líneas celulares continuas. Ejemplos incluyen diversas técnicas, tales como aquellas en Kohler, G. y Milstein, C., *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor y col., *Immunology Today* - 4: 72 (1983); Cole y col., pg. 77-96 en *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc. (1985).

40 Se pueden adaptar técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de EE.UU. N° 4.946.778) para producir anticuerpos de cadena sencilla contra polipéptidos o polinucleótidos útiles en esta invención. Además, se pueden usar ratones transgénicos, u otros organismos o animales, tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados inmuno-específicos para los polipéptidos o polinucleótidos útiles en la invención.

45 Alternativamente, para seleccionar genes de anticuerpos con actividades de unión hacia un polipéptido útil en la invención se puede utilizar la tecnología de presentación en fagos, bien a partir de repertorios de genes v amplificados por PCR de linfocitos procedentes de humanos seleccionados por poseer anti-BASB203 o bien a partir de librerías naif (McCafferty, y col., (1990), *Nature* 348, 552-554; Marks, y col., (1992) *Biotechnology* 10, 779-783). La afinidad de estos anticuerpos también se puede mejorar mediante, por ejemplo, intercambio de cadenas (Clackson y col., (1991) *Nature* 352: 628).

Los anticuerpos descritos anteriormente se pueden emplear para aislar o identificar clones que expresan los polipéptidos o polinucleótidos útiles en la invención para purificar los polipéptidos o polinucleótidos mediante, por ejemplo, cromatografía de afinidad.

55 Así, entre otros, para tratar infecciones se pueden emplear anticuerpos contra el polipéptido BASB203 o el polinucleótido BASB203, particularmente infecciones bacterianas.

Las variantes polipeptídicas incluyen variantes antigénica, epitópica o inmunológicamente equivalentes útiles en esta invención.

60 Preferentemente, el anticuerpo o una de sus variantes se modifica para volverlo menos inmunógeno en el individuo. Por ejemplo, si el individuo es humano, el anticuerpo se puede, lo más preferentemente, "humanizar", en el que la región o regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo derivado de hibridoma se ha trasplantado a un anticuerpo monoclonal humano, por ejemplo, como se describe en Jones y col. (1986), *Nature* 321, 522-525 o Tempest y col., (1991) *Biotechnology* 9, 266-273.

*Agonistas y antagonistas - Ensayos y moléculas*

Los polipéptidos y polinucleótidos útiles en la invención también se pueden usar para valorar la unión de moléculas sustrato y ligando pequeñas en, por ejemplo, células, preparaciones libres de células, librerías químicas, y mezclas de productos naturales. Estos sustratos y ligandos pueden ser sustratos y ligandos naturales o pueden ser miméticos estructurales o funcionales. Véase, por ejemplo, Coligan y col., *Current Protocols in Immunology* 1(2): capítulo 5 (1991).

Los procedimientos de selección pueden simplemente medir la unión de un compuesto candidato al polipéptido o polinucleótido, o a células o membranas que portan el polipéptido o polinucleótido, o a una proteína de fusión del polipéptido por medio de un marcador directa o indirectamente asociado al compuesto candidato. Alternativamente, el procedimiento de selección puede suponer la competición con un competidor marcado. Además, estos procedimientos de selección pueden probar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por activación o inhibición del polipéptido o polinucleótido, usando sistemas de detección apropiados a las células que comprenden el polipéptido o el polinucleótido. Los inhibidores de activación generalmente se someten a ensayo en presencia de un agonista conocido y se observa el efecto sobre la activación por parte del agonista en presencia del compuesto candidato. Para agonistas inversos e inhibidores se pueden emplear polipéptidos constitutivamente activos y/o polipéptidos y polinucleótidos expresados constitutivamente en los procedimientos de selección, en ausencia de un agonista o inhibidor, probando si el compuesto candidato da como resultado la inhibición de la activación del polipéptido o polinucleótido, según sea el caso. Además, los procedimientos de selección pueden simplemente comprender las etapas de mezcla de un compuesto candidato con una disolución que contiene un polipéptido o polinucleótido útil en la presente invención, para formar una mezcla, la medición de la actividad del polipéptido y/o polinucleótido BASB203 en la mezcla, y la comparación de la actividad del polipéptido y/o polinucleótido BASB203 de la mezcla con un patrón. También se pueden usar proteínas de fusión, tales como aquellas preparadas a partir de la porción Fc y del polipéptido BASB203, como se ha descrito anteriormente, en ensayos de selección de alto rendimiento para identificar antagonistas del polipéptido útil en la invención, así como de polipéptidos filogenética y/o funcionalmente relacionados (véase, D. Bennett y col., *J Mol Recognition*, 8:52-58 (1995); y K. Johanson y col., *J Biol Chem*, 270(16):9459-9471 (1995)).

Los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos que se unen y/o interaccionan con un polipéptido útil en la presente invención también se pueden usar para configurar procedimientos de selección para detectar el efecto de compuestos añadidos sobre la producción de ARNm y/o del polipéptido en células. Por ejemplo, se puede construir un ensayo de ELISA para medir los niveles de polipéptido secretado o asociado a la célula usando anticuerpos monoclonales y policlonales mediante procedimientos habituales conocidos en la materia. Esto se puede usar para descubrir agentes que pueden inhibir o mejorar la producción de polipéptido (también denominados antagonistas o agonistas, respectivamente) a partir de células o tejidos manipulados de manera conveniente.

También describimos un procedimiento de selección de compuestos para identificar aquellos que aumentan (agonistas) o bloquean (antagonistas) la acción de polipéptidos o polinucleótidos BASB203, particularmente aquellos compuestos que son bacteriostáticos y/o bactericidas. El procedimiento de selección puede suponer técnicas de alto rendimiento. Por ejemplo, para seleccionar agonistas o antagonistas, se incuba una mezcla de reacción sintética, un compartimento celular, tal como una membrana, la envuelta celular o la pared celular, o una preparación de cualquiera de ellos, que comprende el polipéptido BASB203 y un sustrato o ligando marcado de ese polipéptido, en ausencia o presencia de una molécula candidata que puede ser un agonista o antagonista de BASB203. La capacidad de la molécula candidata para agonizar o antagonizar el polipéptido BASB203 se refleja en una unión reducida del ligando marcado o una producción reducida de producto a partir de ese sustrato. Las moléculas que se unen gratuitamente, es decir, sin inducir los efectos del péptido BASB203 muy probablemente serán buenos antagonistas. Las moléculas que se unen bien y, según sea el caso, incrementen la velocidad de producción del producto partir del sustrato, incrementen la transducción de señales, o incrementen la actividad de los canales químicos serán agonistas. La detección de la velocidad o el nivel de, según sea el caso, producción de producto a partir de sustrato, transducción de señales, o actividad de los canales químicos se puede mejorar usando un sistema informador. Los sistemas informadores que pueden ser útiles en este aspecto incluyen, pero no están limitados a, sistemas colorimétricos, sustrato marcado convertido en producto, un gen informador que es sensible a cambios en la actividad del polinucleótido o polipéptido BASB203, y ensayos de unión conocidos en la materia.

Otro ejemplo de un ensayo para agonistas de BASB203 es un ensayo competitivo que combina BASB203 y un agonista potencial con moléculas de unión a BASB203, moléculas de unión a BASB203 recombinantes, sustratos o ligandos naturales, o miméticos de sustratos o ligandos, en condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitivo. El BASB203 puede estar marcado, tal como mediante radiactividad o un compuesto colorimétrico, de manera que se puede determinar de manera precisa el número de moléculas de BASB203 unidas a una molécula de unión o convertidas en producto para valorar la eficacia del antagonista potencial.

Los antagonistas potenciales incluyen, entre otros, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, polipéptidos y anticuerpos que se unen a un polinucleótido y/o polipéptido útil en la invención y así inhiben o extinguen su actividad o expresión. Los antagonistas potenciales también pueden ser moléculas orgánicas pequeñas, un péptido, un polipéptido tal como una proteína íntimamente relacionada o un anticuerpo que se una a los mismos sitios sobre una molécula de unión, tal como una molécula de unión, sin inducir las actividades inducidas por BASB203, previniendo así la acción o expresión de polipéptidos y/o polinucleótidos BASB203 al evitar la unión de polipéptidos y/o polinucleótidos BASB203.

## ES 2 333 410 T3

Los antagonistas potenciales incluyen una molécula pequeña que se une a y ocupa el sitio de unión del polipéptido, evitando la unión a moléculas de unión celulares, de manera que se previene la actividad biológica normal. Ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no están limitadas a, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos o moléculas similares a péptidos. Otros antagonistas potenciales incluyen moléculas antisentido (véase, Okano, J. Neurochem. 56: 560 (1991); OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION, CRC Press, Boca Raton, FL (1988), para una descripción de estas moléculas). Antagonistas potenciales preferidos incluyen compuestos relacionados con y variantes de BASB203.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a proteínas de fusión solubles manipuladas genéticamente que comprenden un polipéptido útil en la presente invención, o uno de sus fragmentos, y diversas porciones de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de diversas subclases (IgG, IgM, IgA, IgE). Como inmunoglobulina preferida está la parte constante de la cadena pesada de la IgG humana, particularmente IgG1, en la que la fusión tiene lugar en la región bisagra. En una forma de realización particular, la parte Fc se puede eliminar simplemente con la incorporación de una secuencia de escisión que se puede escindir con el factor de coagulación sanguíneo Xa. Además, esta invención se refiere a procedimientos para la preparación de estas proteínas de fusión mediante ingeniería genética, y a su uso para la selección de fármacos, el diagnóstico y terapia. Un aspecto adicional de la invención también se refiere a polinucleótidos que codifican esas proteínas de fusión. Ejemplos de tecnología de proteínas de fusión se pueden encontrar en las Solicitudes de patente internacional N° WO 94/29458 y WO 94/22914.

Cada una de las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento se puede usar en el descubrimiento y desarrollo de compuestos antibacterianos. La proteína codificada, tras su expresión, se puede usar como diana para la selección de fármacos antibacterianos. Adicionalmente, se pueden usar las secuencias de polinucleótidos que codifican las regiones aminotermiales de la proteína codificada o las secuencias Shine-Delgamo u otras secuencias que facilitan la reducción de los respectivos ARNm para construir secuencias antisentido para controlar la expresión de la secuencia codificante de interés.

La invención también proporciona el uso del polipéptido y del polinucleótido útiles en la invención y el uso de agonistas o antagonistas identificados usando dicho polipéptido o polinucleótido para interferir con la interacción física inicial entre un patógeno o patógenos y un hospedador eucariota, preferentemente un mamífero, responsable de las secuelas de la infección. En particular, las moléculas de la invención se pueden usar: en la prevención de la adhesión de bacterias, en particular, bacterias gram-positiva y/o gram-negativa, a proteínas de la matriz extracelular de eucariotas, preferentemente de mamífero, sobre dispositivos permanentes o a proteínas de la matriz extracelular de heridas; para bloquear la adhesión bacteriana entre proteínas de la matriz extracelular de eucariotas, preferentemente de mamífero, y proteínas BASB203 bacterianas que median en el daño tisular y/o; bloquean la progresión normal de la patogénesis en infecciones iniciadas distintas a la implantación de los dispositivos permanentes o por otras técnicas quirúrgicas.

Nosotros describimos agonistas y antagonistas BASB203, preferentemente agonistas y antagonistas bacteriostáticos o bactericidas.

Los antagonistas y agonistas se pueden emplear, por ejemplo, para evitar, inhibir y/o tratar enfermedades.

En una forma de realización adicional, la presente invención se refiere a mimótopos del polipéptido útil en la invención. Un mimótopo es una secuencia peptídica, suficientemente similar al péptido nativo (secuencial o estructuralmente), que es capaz de ser reconocido por anticuerpos que reconocen el péptido nativo; o es capaz de generar la producción de anticuerpos que reconocen el péptido nativo cuando se acopla a un vehículo adecuado.

Los mimótopos peptídicos se pueden diseñar para un fin particular mediante la adición, delección o sustitución de aminoácidos seleccionados. Así, los péptidos se pueden modificar con el fin de facilitar la conjugación a un vehículo de proteínas. Por ejemplo, para algunos procedimientos de conjugación química puede ser deseable incluir una cisteína terminal. Además, para péptidos conjugados a un vehículo de proteínas puede ser deseable incluir un término hidrófobo distal del término conjugado del péptido, de manera que el extremo libre sin conjugar del péptido permanece asociado a la superficie de la proteína portadora. De esta forma se presenta el péptido en una conformación que se asemeja muchísimo a la del péptido que se encuentra en el contexto de la molécula nativa completa. Por ejemplo, los péptidos se pueden alterar para tener una cisteína N-terminal y una cola amidada hidrófoba C-terminal. Alternativamente, se puede llevar a cabo la adición o sustitución de una forma D-esteroisomérica de uno o más de los aminoácidos (secuencias inversas) para crear un derivado beneficioso, por ejemplo, para mejorar la estabilidad del péptido. Los mimótopos también pueden ser retro-secuencias de las secuencias peptídicas naturales, en las que se ha invertido la orientación de la secuencia. Los mimótopos también pueden tener un carácter retro-inverso. Los péptidos retro, inversos y retro-inversos se describen en los documentos WO 95/24916 y WO 94/05311.

Alternativamente, los mimótopos peptídicos se pueden identificar usando anticuerpos que son capaces de unirse a los polipéptidos útiles en la presente invención usando técnicas tales como tecnología de presentación en fagos (EP 0 552 267 B1). Esta técnica genera un gran número de secuencias peptídicas que mimetizan la estructura de los péptidos nativos y por tanto, son capaces de unirse a anticuerpos anti-péptidos nativos, pero ellos mismos pueden no compartir necesariamente una homología de secuencia significativa con el polipéptido nativo.

## Vacunas

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para inducir una respuesta inmunitaria en un individuo, particularmente un mamífero, preferentemente seres humanos, que comprende la inoculación al individuo con un polinucleótido y/o polipéptido BASB203, o un fragmento o una de sus variantes, adecuado para producir un anticuerpo y/o una respuesta inmunitaria de linfocitos T para proteger a dicho individuo de una infección, particularmente una infección bacteriana y más particularmente una infección por *H. influenzae* no tipificable. También se proporcionan procedimientos por los que esa respuesta inmunitaria retrasa la replicación bacteriana. Otro aspecto más de la invención se refiere a un procedimiento para la inducción de una respuesta inmunitaria en un individuo que comprende la administración a ese individuo de un vector de ácidos nucleicos, una secuencia o una ribozima para la expresión directa del polinucleótido y/o polipéptido BASB203, o un fragmento o una de sus variantes, para expresar el polinucleótido y/o polipéptido BASB203, o un fragmento o una de sus variantes *in vivo* para inducir una respuesta inmunitaria, tal como producir un anticuerpo y/o una respuesta inmunitaria de linfocitos T, incluyendo, por ejemplo, linfocitos T que producen citoquinas o linfocitos T citotóxicos, para proteger a dicho individuo, preferentemente un ser humano, de una enfermedad, tanto si la enfermedad ya está establecida en el individuo, como si no. Un ejemplo de administración del gen es acelerándolo hacia las células deseadas en forma de recubrimientos sobre partículas o de otra manera. Ese vector de ácidos nucleicos puede comprender ADN, ARN, una ribozima, un ácido nucleico modificado, un híbrido de ADN/ARN, un complejo de ADN-proteína o un complejo de ARN proteína.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición inmunológica que cuando se introduce en un individuo, preferentemente un ser humano, capaz de inducir en él una respuesta inmunitaria, induce una respuesta inmunitaria en ese individuo a un polinucleótido BASB203 y/o un polipéptido codificado a partir de éste, en el que la composición comprende un polinucleótido BASB203 y/o un polipéptido codificado a partir de éste y/o comprende ADN y/o ARN que codifica y expresa un antígeno de dicho polinucleótido BASB203, polipéptido codificado a partir de éste, u otro polipéptido útil en la invención. La respuesta inmunitaria se puede usar terapéutica o profilácticamente y puede adoptar la forma de inmunidad por anticuerpos y/o inmunidad celular, tal como inmunidad celular que aparece con CTL o linfocitos T CD4+.

El polipéptido BASB203 o uno de sus fragmentos se puede fusionar con una co-proteína o un resto químico que puede producir por sí mismo, o no, anticuerpos, pero que es capaz de estabilizar la primera proteína y producir una proteína fusionada o modificada que tendrá propiedades antigénicas y/o inmunógenas, y preferentemente propiedades protectoras. La proteína recombinante fusionada de esta forma, preferentemente comprende de manera adicional una co-proteína antigénica, tal como la lipoproteína D de *Haemophilus influenzae*, la glutatión-S-transferasa (GST) o beta-galactosidasa, o cualquier otra co-proteína relativamente grande que solubilice la proteína y facilite su producción y purificación. Además, la co-proteína puede actuar como adyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmunitario del organismo que reciba la proteína. La co-proteína puede estar unida al amino- o carboxi-término de la primera proteína.

En una composición de vacuna según la invención, puede estar presente un polipéptido y/o polinucleótido BASB203, o un fragmento, o un mimótopo, o una de sus variantes en un vector, tal como los vectores recombinantes vivos descritos anteriormente, por ejemplo, vectores bacterianos vivos.

Para el polipéptido BASB203 también son adecuados vectores no vivos, por ejemplo, vesículas de la membrana externa bacteriana o "ampollas". Las ampollas de la ME se derivan de la membrana externa de la membrana de dos capas de bacterias gram-negativa y han sido documentadas en muchas bacterias gram-negativa (Zhou, L y col. 1998. FEMS Microbiol. Lett. 163:223-228) incluyendo *C. trachomatis* y *C. psittaci*. Una lista no exhaustiva de patógenos bacterianos de los que se ha informado que producen ampollas también incluye: *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi*, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Yersinia enterocolitica*.

Las ampollas presentan la ventaja de proporcionar proteínas de la membrana externa en su conformación nativa y así son particularmente útiles para vacunas. Las ampollas también se pueden mejorar para su uso en vacunas modificando genéticamente la bacteria para así modificar la expresión de una o más moléculas en la membrana externa. Así, por ejemplo, se puede introducir o regular hacia arriba (por ejemplo, alterando el promotor) la expresión de una proteína inmunógena deseada en la membrana externa, tal como el polipéptido BASB203. En lugar de eso o además, se puede regular hacia abajo la expresión de moléculas de la membrana externa que bien no son relevantes (por ejemplo, antígenos no protectores o inmunodominantes, excepto proteínas variables) o perjudiciales (por ejemplo, moléculas tóxicas como el LPS, o inductores potenciales de una respuesta autoinmunitaria). Estas aproximaciones se describen con mayor detalle a continuación. Las regiones flanqueantes no codificantes del gen BASB203 contienen elementos reguladores importantes en la expresión del gen. Esta regulación tiene lugar tanto a nivel transcripcional como a nivel traduccional. La secuencia de estas regiones, aguas arriba o aguas abajo del marco de lectura abierto del gen, se puede obtener por secuenciación de ADN. Esta información de la secuencia permite la determinación de motivos reguladores potenciales tales como los diferentes elementos promotores, secuencias terminadoras, elementos de secuencia inducibles, represores, elementos que responden a la variación de fase, la secuencia Shine-Dalgarno, regiones con potencial estructura secundaria involucradas en la regulación, así como otros tipos de motivos o secuencias reguladoras. Esta secuencia se puede usar en la presente invención. Además, la SEQ ID NO: 11 es la secuencia aguas arriba de *Haemophilus influenzae* no tipificable (aguas arriba del codón de iniciación predicho de los genes preferidos) que comprende aproximadamente 1000 pb.

## ES 2 333 410 T3

Esta información de la secuencia permite la modulación de la expresión natural del gen BASB203. La regulación hacia arriba de la expresión del gen se puede conseguir alterando el promotor, la secuencia Shine-Dalgarno, potenciales elementos represores u operadores, o cualquier otro elemento involucrado. Asimismo, la regulación hacia abajo de la expresión se puede conseguir mediante tipos de modificación similares. Alternativamente, cambiando las secuencias de variación de fase, la expresión del gen se puede poner bajo el control de la variación de fase, o se puede desacoplar de esta regulación. En otra aproximación, la expresión del gen se puede poner bajo el control de uno o más elementos inducibles que permitan una expresión regulada. Ejemplos de esa regulación incluyen, pero no están limitados a, inducción por variación de temperatura, adición de sustratos inductores como carbohidratos seleccionados o sus derivados, oligoelementos, vitaminas, cofactores, iones metálicos, etc.

Modificaciones como las descritas anteriormente se pueden introducir mediante diversos medios diferentes. La modificación de secuencias involucradas en la expresión génica se puede llevar a cabo *in vivo* por mutagénesis aleatoria, seguido por selección para el fenotipo deseado. Otra aproximación consiste en el aislamiento de la región de interés y su modificación por mutagénesis aleatoria, o mutagénesis por sustitución, inserción o delección dirigida de sitio. A continuación la región modificada se puede reintroducir en el genoma bacteriano por recombinación homóloga, y se puede valorar el efecto sobre la expresión génica. En otra aproximación, se puede usar el conocimiento de la región de interés de la secuencia para sustituir o eliminar todas o parte de las secuencias reguladoras naturales. En este caso, la región reguladora diana se aísla y se modifica para que contenga los elementos reguladores de otro gen, una combinación de elementos reguladores de genes diferentes, una región reguladora sintética, o cualquier otra región reguladora, o para eliminar partes seleccionadas de las secuencias reguladoras de tipo silvestre. A continuación estas secuencias modificadas se pueden reintroducir en la bacteria mediante recombinación homóloga en el genoma. Una lista no exhaustiva de promotores preferidos que se podrían usar para la regulación hacia arriba de la expresión génica incluye los promotores *porA*, *porB*, *lbpB*, *tbpB*, *p110*, *1st*, *hpuAB* de *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae*; *ompCD*, *copB*, *1bpB*, *ompE*, *UspA1*; *UspA2*; *TbpB* de *M. catarrhalis*; *p1*, *p2*, *p4*, *p5*, *p6*, *lpD*, *tbpB*, *D15*, *Hia*, *Hmw1*, *Hmw2* de *H. influenzae*.

En un ejemplo, la expresión del gen se puede modular intercambiando su promotor con un promotor más fuerte (a través del aislamiento de la secuencia aguas arriba del gen, modificación *in vitro* de esta secuencia, y reintroducción en el genoma por recombinación homóloga). Se puede obtener una expresión regulada hacia arriba tanto en la bacteria como en las vesículas de la membrana externa desprendidas (o preparadas) procedentes de la bacteria.

En otros ejemplos, se pueden usar las aproximaciones descritas para generar cepas bacterianas recombinantes con características mejoradas para aplicaciones en vacunas. Éstas pueden ser, pero no están limitadas a, cepas atenuadas, cepas con una expresión incrementada de antígenos seleccionados, cepas *knockouts* (o expresión reducida) de genes que interfieren con la respuesta inmunitaria, cepas con la expresión modulada de proteínas inmunodominantes, cepas con desprendimiento modulado de vesículas de la membrana externa.

En la presente invención se puede usar una región aguas arriba modificada del gen BASB203, cuya región aguas arriba modificada contiene un elemento regulador heterólogo que altera el nivel de expresión de la proteína BASB203 localizada en la membrana externa. La región aguas arriba según esta forma de realización de la invención incluye la secuencia aguas arriba del gen BASB203. La región aguas arriba comienza inmediatamente aguas arriba del gen BASB203 y normalmente continúa hasta una posición no más allá de 1000 pb aproximadamente aguas arriba del codón de iniciación ATG. En el caso de un gen localizado en una secuencia policistónica (operón) la región aguas arriba puede comenzar precediendo inmediatamente al gen de interés, o precediendo al primer gen en el operón. Preferentemente, una región aguas arriba modificada según esta forma de realización de la invención contiene un promotor heterólogo en una posición entre 500 y 700 pb aguas arriba del codón ATG.

En la presente invención se pueden usar las regiones aguas arriba descritas para regular hacia arriba la expresión del gen BASB203, un procedimiento para conseguir esto mediante recombinación homóloga (por ejemplo, como se describe en el documento WO 01/09350 incorporado en el presente documento por referencia), un vector que comprende una secuencia aguas arriba adecuada para este propósito, y una célula hospedadora.

Así, la invención también proporciona composiciones que comprenden un polipéptido BASB203, en una ampolla bacteriana modificada. Nosotros describimos células hospedadoras modificadas capaces de producir los vectores ampolla basados en membrana no vivos, y vectores de ácidos nucleicos que comprenden el gen BASB203 que presentan una región aguas arriba modificada que contiene un elemento regulador heterólogo.

Además, describimos procedimientos para preparar las células hospedadoras y las ampollas bacterianas útiles en la invención.

Esta invención también proporciona composiciones, particularmente composiciones de vacuna, y procedimientos que comprenden los polipéptidos y/o polinucleótidos y secuencias de ADN inmunoestimuladoras, tales como aquellas descritas en Sato, Y. y col. *Science* 273: 352 (1996).

Además, esta invención proporciona procedimientos que usan el polinucleótido descrito, o uno de sus fragmentos particulares, que se ha demostrado que codifica regiones variables de proteínas de la superficie de células bacterianas, en construcciones de polinucleótidos usadas en experimentos de inmunización genética en modelos de infección en

## ES 2 333 410 T3

animales con *H. influenzae* no tipificable. Esos experimentos serán particularmente útiles para la identificación de epítomos de proteínas capaces de provocar una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica. Se cree que esta aproximación permitirá la preparación posterior de anticuerpos monoclonales de valor particular, derivados del órgano preciso del animal que resiste o aclara con éxito la infección, para el desarrollo de agentes profilácticos o tratamientos terapéuticos de infección bacteriana, particularmente de infección por *H. influenzae* no tipificable, en mamíferos, particularmente seres humanos.

La invención también incluye una formulación de vacunas que comprende un polipéptido y/o polinucleótido recombinante inmunógeno útil en la invención junto con un vehículo adecuado, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable. Puesto que los polipéptidos y polinucleótidos se pueden degradar en el estómago, cada uno de ellos preferentemente se administra parenteralmente, incluyendo, por ejemplo, una administración que es subcutánea, intramuscular, intravenosa, o intradérmica. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen disoluciones estériles para inyección acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, compuestos bacteriostáticos y solutos que harán que la formulación sea isotónica con los fluidos corporales, preferentemente la sangre, del individuo; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores o agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en contenedores monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados y se pueden almacenar en condiciones de crio-deseccación que sólo necesita la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso.

La formulación de vacuna de la invención también puede incluir sistemas adyuvantes para incrementar la inmunogenicidad de la formulación. Preferentemente el sistema adyuvante aumenta preferentemente una respuesta de tipo TH1.

Se puede distinguir ampliamente una respuesta inmunitaria en dos categorías extremas, siendo respuestas inmunitarias humorales o mediadas por células (tradicionalmente caracterizadas por mecanismos de protección efectores por anticuerpos y celulares, respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado respuestas de tipo TH1 (respuesta mediada por células), y respuestas inmunitarias de tipo TH2 (respuesta humoral).

Las respuestas inmunitarias de tipo TH1 extremas se pueden caracterizar por la generación de linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno y de haplotipo restringido, y respuestas de células asesinas naturales. En ratones, las respuestas de tipo TH1 a menudo se caracterizan por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras en humanos estos corresponden a anticuerpos de tipo IgG1. Las respuestas inmunitarias de tipo TH2 se caracterizan por la generación de un amplio espectro de isotipos de inmunoglobulinas incluyendo, en ratones, IgG1, IgA, e IgM.

Se puede considerar que la fuerza conductora detrás del desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunitarias son las citoquinas. Niveles elevados de citoquinas de tipo TH1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células hacia el antígeno dado, mientras que niveles elevados de citoquinas de tipo TH2 tienen a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales hacia el antígeno.

La distinción de respuestas inmunitarias de tipo TH1 y TH2 no es absoluta. En realidad, un individuo desarrollará una respuesta inmunitaria que se describe como predominantemente TH1 o predominantemente TH2. No obstante, a menudo es conveniente considerar a las familias de citoquinas en los términos descritos en los clones de linfocitos T CD4 +ve murinos por Mosmann y Coffman (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7, p145-173). Tradicionalmente, las respuestas de tipo TH1 se asocian a la producción de las citoquinas INF- $\gamma$  e IL-2 por los linfocitos T. Otras citoquinas a menudo directamente asociadas a la inducción de las respuestas inmunitarias de tipo TH1 no son producidas por células T, tales como la IL-12. En contraste, las respuestas de tipo TH2 están asociadas a la secreción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13.

Es sabido que ciertos adyuvantes de vacunas son particularmente adecuados para la estimulación de las respuestas de citoquinas de tipo TH1 o TH2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del equilibrio TH1:TH2 de la respuesta inmunitaria después de una vacunación o infección incluyen la medición directa de la producción de citoquinas TH1 o TH2 por linfocitos T *in vitro* después de la estimulación con el antígeno, y/o la medición de la relación IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpos específicos al antígeno.

Así, un adyuvante de tipo TH1 es uno que estimula preferentemente poblaciones de células T aisladas para producir niveles elevados de citoquinas de tipo TH1 cuando se reestiman con antígeno *in vitro*, y promueve el desarrollo tanto de respuestas de linfocitos T citotóxicos CD8+ como de respuestas de inmunoglobulinas específicas al antígeno asociadas al isotipo de tipo TH1.

Los adyuvantes que son capaces de una estimulación preferente de la respuesta celular TH1 se describen en la Solicitud de patente internacional N° WO 94/00153 y WO 95/17209.

El monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (3D-MPL) es uno de esos adyuvantes. Se conoce del documento GB 2220211 (Ribi). Químicamente, es una mezcla de monofosforil lípido A 3 des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas y es fabricado por Ribi Immunochem, Montana. Una forma preferida del monofosforil lípido A 3 des-O-acilado se divulga en la patente europea 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

## ES 2 333 410 T3

Preferentemente, las partículas de 3D-MPL son suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (número de patente europea 0 689 454). El 3D-MPL estará presente en el intervalo de 10  $\mu\text{g}$  - 100  $\mu\text{g}$ , preferentemente 25-50  $\mu\text{g}$  por dosis, en la que el antígeno normalmente estará presente en un intervalo de 2-50  $\mu\text{g}$  por dosis.

5 Otro adyuvante preferido comprende QS21, una fracción no tóxica purificada de Hplc derivada de la corteza de *Quillaja Saponaria Molina*. Opcionalmente, éste se puede mezclar con monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (3D-MPL), opcionalmente junto con un vehículo.

10 El procedimiento de producción de QS21 se divulga en la patente de EE.UU. N° 5.057.540.

Previamente se han descrito formulaciones adyuvantes no reactógenas que contienen QS21 (WO 96/33739). Esas formulaciones que comprenden QS21 y colesterol han demostrado ser adyuvantes que estimulan con éxito la respuesta de tipo TH1 cuando se formulan junto con un antígeno.

15 Adyuvantes adicionales que son estimuladores preferenciales de la respuesta celular TH1 incluyen oligonucleótidos inmunomoduladores, por ejemplo, secuencias CpG sin metilar, como se divulga en el documento WO 96/02555.

20 También se contemplan combinaciones de adyuvantes diferentes que estimulan la respuesta TH1, tales como aquellos mencionados anteriormente, como el suministro de un adyuvante que es un estimulador preferente de la respuesta celular TH1. Por ejemplo, el QS21 se puede formular junto con 3D-MPL. La relación de QS21:3D-MPL normalmente será del orden de 1:10 a 10:1; preferentemente de 1:5 a 5:1 y a menudo sustancialmente de 1:1. El intervalo preferido para una sinergia óptima es de 2,5:1 a 1:1 de 3D-MPL:QS21.

25 Preferentemente, según la invención también está presente un vehículo en la composición de vacuna. El vehículo puede ser una emulsión de aceite en agua, o una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

30 Una emulsión de aceite en agua preferida comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, alfa-tocoferol y Tween 80. En un aspecto particularmente preferido los antígenos en la composición de vacuna según la invención se combinan con QS21 y 3D-MPL en esa emulsión. Adicionalmente, la emulsión de aceite en agua puede contener Span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

35 Normalmente, para la administración a seres humanos, QS21 y 3D-MPL estarán presentes en una vacuna en un intervalo de 1  $\mu\text{g}$  - 200  $\mu\text{g}$ , tal como 10-100  $\mu\text{g}$ , preferentemente de 10  $\mu\text{g}$  - 50  $\mu\text{g}$  por dosis. Normalmente, la emulsión de aceite en agua comprenderá entre el 2 y el 10% de escualeno, entre el 2 y el 10% de alfa-tocoferol y entre el 0,3 y el 3% de Tween 80. Preferentemente, la relación de escualeno:alfa-tocoferol es igual o inferior a 1 puesto que esto proporciona una emulsión más estable. También puede estar presente Span 85 a un nivel del 1%. En algunos casos puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención además contengan un estabilizante.

40 Las emulsiones de aceite en agua no tóxicas preferentemente contienen un aceite no tóxico, por ejemplo, escualano o escualeno, un emulsionante, por ejemplo, Tween 80, en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo, tampón fosfato salino.

45 Una formulación adyuvante particularmente potente que incluye QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210.

50 Aunque la invención se ha descrito con referencia a ciertos polipéptidos y polinucleótidos BASB203, se debe entender que esto cubre fragmentos de los polipéptidos y polinucleótidos de origen natural, y polipéptidos y polinucleótidos similares con adiciones, deleciones o sustituciones que no afecten sustancialmente a las propiedades inmunógenas de los polipéptidos o polinucleótidos recombinantes. Fragmentos/péptidos preferidos se describen en el Ejemplo 13.

55 La presente invención también proporciona una composición de vacuna polivalente que comprende una formulación de vacuna de la invención en combinación con otros antígenos, en particular antígenos útiles para el tratamiento de la otitis media. Esa composición de vacuna polivalente puede incluir un adyuvante que induzca la respuesta TH1 como se ha descrito anteriormente.

60 En una forma de realización preferida, los polipéptidos, fragmentos e inmunógenos útiles en la invención se formulan con uno o más de los siguientes grupos de antígenos: a) uno o más polisacáridos capsulares de pneumococos (solos o conjugados a una proteína portadora); b) uno o más antígenos que pueden proteger a un hospedador frente a una infección por *M. catarrhalis*; c) uno o más antígenos de proteína que pueden proteger a un hospedador frente a una infección por *Streptococcus pneumoniae*; d) uno o más antígenos de proteína de *Haemophilus influenzae* no tipificable adicionales; e) uno o más antígenos que pueden proteger a un hospedador frente a RSV; y f) uno o más antígenos que pueden proteger a un hospedador frente al virus de la gripe. Se prefieren las combinaciones con: grupos a) y b); b) y c); b), d), y a) y/o c); b), d), e), f), y a) y/o c). Esas vacunas se pueden usar de manera ventajosa como vacunas globales para la otitis media.

## ES 2 333 410 T3

Los antígenos del polisacárido capsular de pneumococo se seleccionan preferentemente entre los 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 (lo más preferentemente entre los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F).

5 Los antígenos de proteína de pneumococo preferidos son aquellas proteínas de pneumococo que están expuestas sobre la superficie externa del pneumococo (capaces de ser reconocidas por el sistema inmunitario de un hospedador durante al menos parte del ciclo de vida del pneumococo), o son proteínas que se segregan o son liberadas por el pneumococo. Más preferentemente, la proteína es una toxina, una adhesina, un transductor de señal de dos componentes, o una lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae*, o uno de sus fragmentos. Las proteínas particularmente preferidas incluyen, pero no están limitadas a: pneumolisina (preferentemente detoxificada por tratamiento químico o mutación) [Mitchell y col. Nucleic Acids Res. 11 de Jul. de 1990; 18(13): 4010 “Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2.”; Mitchell y col. Biochim Biophys Acta, 23 de Ene. de 1989; 1007 (1): 67-72 “Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties”]; documento WO 96/05859 (A. Cyanamid), documento WO 90/06951 (Paton y col), documento WO 99/03884 (NAVA)]; PspA y sus variantes de delección transmembrana (documentos WO 92/14488; WO 99/53940; US 5804193 - Briles y col.); PspC y sus variantes de delección transmembrana (documentos WO 99/53940; WO 97/09994 - Briles y col.); PsaA y sus variantes de delección transmembrana (Berry & Paton, Infect Immun Dic. 1996; 64(12):5255-62 “Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*”); proteínas de unión a colina de pneumococo y sus variantes de delección transmembrana; CbpA y sus variantes de delección transmembrana (documentos WO 97/41151; WO 99/51266); gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Infect. Immun. 1996 64:3544); HSP70 (documento WO 96/40928); PcpA (Sánchez-Beato y col. FEMS Microbiol Lett 1998, 164:207-14); proteína de tipo M, solicitud de patente SB N° EP 0837130; y adhesina 18627 (solicitud de patente SB N° EP 0834568). Antígenos de proteínas de pneumococo preferidos adicionales son aquellos descritos en el documento WO 98/18931, particularmente aquellos seleccionados en el documento WO 98/18930 y PCT/US99/30390.

25 Antígenos de proteína de *Moraxella catarrhalis* preferidos que se pueden incluir en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de la otitis media) son: OMP106 [documentos WO 97/41731 (Antex) y WO 96/34960 (PMC)]; OMP21; LbpA y/o LbpB [documento WO 98/55606 (PMC)]; TbpA y/o TbpB [documentos WO 97/13785 y WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, y col. (1993) Infect. Immun. 61:2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [documento WO 93/03761 (Universidad de Texas)]; OmpCD; HasR (documento PCT/EP99/03824); PilQ (documento PCT/EP99/03823); OMP85 (documento PCT/EP00/01468); lipo06 (documento GB 9917977.2); lipo10 (documento GB 9918208.1); lipo11 (documento GB 9918302.2); lipo18 (documento GB 9918038.2); P6 (documento PCT/EP99/03038); D15 (documento PCT/EP99/03822); Omp1A1 (documento PCT/EP99/06781); Hly3 (documento PCT/EP99/03257); y OmpE.

35 Antígenos preferidos adicionales de proteínas de *Haemophilus influenzae* no tipificable que se pueden incluir en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de la otitis media) incluyen: proteína fimbrina [(documento US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] y fusiones que comprenden péptidos a partir de la misma [por ejemplo, LB1(f) fusiones de péptidos; documento US 5843464 (OSU) o WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (Universidad del estado de Nueva York)]; proteína D (documento EP 594610); TbpA y/o TbpB; Hia; Hsf; Hin47; Hif; Hmw1; Hmw2; Hmw3; Hmw4; Hap; D15 (documento WO 94/12641); P2; y P5 (documento WO 94/26304).

45 Antígenos del virus de la gripe preferidos incluyen virus completos, vivos o inactivados, separados del virus de la gripe, crecidos en huevos o en células MDCK, o en células Vero o virosomas de la gripe enteros (como se describe por R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915-920) o sus proteínas purificadas o recombinantes, tales como las proteínas HA, NP, NA, o M, o sus combinaciones.

50 Antígenos del RSV preferidos (virus sincitial respiratorio) incluyen la glicoproteína F, la glicoproteína G, la proteína HN, o sus derivados.

### Composiciones, kits y administración

55 En un aspecto adicional de la invención se proporcionan composiciones que comprenden un polinucleótido BASB203 y/o un polipéptido BASB203 para su administración a una célula o a un organismo multicelular.

60 La invención también se refiere a composiciones que comprenden un polinucleótido y/o polipéptidos descritos en el presente documento o sus agonistas o antagonistas. Los polipéptidos y polinucleótidos útiles en la invención se pueden emplear en combinación con un vehículo o vehículos estériles o no estériles para su uso con células, tejidos o organismos, tal como un vehículo farmacéutico adecuado para su administración a un individuo. Estas composiciones comprenden, por ejemplo, un medio aditivo o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido y/o polinucleótido útiles en la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Esos vehículos pueden incluir, pero no están limitados a, solución salina, tampón salino, dextrosa, agua, glicerol, etanol y sus combinaciones. La formulación se debe ajustar al modo de administración. Además describimos paquetes y kits diagnósticos y farmacéuticos que comprenden uno o más contenedores rellenos con uno o más de los principios de las composiciones de la invención anteriormente mencionadas.

## ES 2 333 410 T3

Los polipéptidos, polinucleótidos y los otros compuestos se pueden emplear solos o en combinación con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos.

5 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de cualquier manera efectiva y conveniente incluyendo, por ejemplo, la administración por vía tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica, entre otras.

10 En terapia o como profiláctico, el agente activo se puede administrar a un individuo en forma de composición inyectable, por ejemplo, en forma de dispersión acuosa estéril, preferentemente isotónica.

15 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido y/o polinucleótido, tal como la forma soluble de un polipéptido y/o polinucleótido útil en la presente invención, en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Esos vehículos incluyen, pero no están limitados a, solución salina, tampón salino, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y sus combinaciones. La invención además se refiere a paquetes y kits farmacéuticos que comprenden uno o más contenedores rellenos con uno o más de los principios de las composiciones de la invención anteriormente mencionadas. Los polipéptidos, polinucleótidos y otros compuestos se pueden emplear solos o en combinación con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos.

20 La composición se adaptará a la vía de administración, por ejemplo, por una vía sistémica u oral. Las formas de administración sistémica preferidas incluyen inyección, normalmente mediante inyección intravenosa. Se pueden usar otras vías de inyección, tales como inyección subcutánea, intramuscular, o intraperitoneal. Medios alternativos para la administración sistémica incluyen la administración por vía transmucosa y transdérmica usando penetrantes tales como sales biliares o ácidos fusídicos u otros detergentes. Además, si un polipéptido u otro compuesto útil en la presente  
25 invención se pueden formular en una formulación entérica o encapsulada, también es posible la administración por vía oral. La administración de estos compuestos también puede ser tópica y/o localizada, en forma de bálsamos, pastas, geles, disoluciones, polvos y similares.

30 Para la administración a mamíferos, y particularmente a humanos, se espera que el nivel de dosificación diario del agente activo estará entre 0,01 mg/kg y 10 mg/kg, normalmente en torno a 1 mg/kg. En cualquier caso, el facultativo determinará la dosificación real que será la más adecuada para el individuo y que variará con la edad, el peso y la respuesta del individuo particular. Las dosificaciones anteriores son ejemplos del caso promedio. Naturalmente, puede haber casos individuales en los que se requieran intervalos de dosificación superiores o inferiores, y tales casos están dentro del alcance de la invención.

35 El intervalo de dosificación preferido depende de la elección del péptido, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la dolencia del sujeto, y la valoración del facultativo que atiende. No obstante, las dosificaciones adecuadas se encuentran en el intervalo de 0,1-100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal del sujeto.

40 Una composición de vacuna está de manera conveniente en forma inyectable. Se pueden emplear adyuvantes convencionales para aumentar la respuesta inmunitaria. Una dosis unitaria adecuada para la vacunación es de 0,5-5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de antígeno, y esa dosis preferentemente se administra 1-3 veces y con un intervalo de 1-3 semanas. Con el intervalo de dosificación indicado, no se observarán efectos toxicológicos adversos con los compuestos útiles en la invención que impedirían su administración a individuos adecuados.

45 No obstante, en vista de la variedad de compuestos disponibles y de las diferentes eficiencias de las diversas vías de administración se deben esperar amplias variaciones en las necesidades de dosificación. Por ejemplo, se espera que la administración oral requiera dosificaciones más elevadas que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar usando rutinas empíricas normales para su optimización, como es bien conocido en la materia.

### *Bases de datos de secuencias, secuencias en un medio tangible, y algoritmos*

55 Las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos forman una fuente de información valiosa con la que determinar sus estructuras bi- y tridimensionales, así como para identificar secuencias adicionales de homología similar. Estas aproximaciones se facilitan de la manera más sencilla almacenando la secuencia en un medio legible por un ordenador y a continuación usando los datos almacenados en un programa de estructuras macromoleculares conocido o para buscar en una base de datos de secuencias usando herramientas de búsqueda muy conocidas, tales como el paquete de software GCG.

60 Nosotros describimos procedimientos para el análisis del carácter de secuencias o cadenas, particularmente secuencias genéticas o secuencias de proteínas codificadas. Los procedimientos preferidos para el análisis de secuencias incluyen, por ejemplo, procedimientos de análisis de homología de secuencias, tales como análisis de identidad y similitud, análisis de estructuras de ADN, ARN y proteínas, ensamblaje de secuencias, análisis cladístico, análisis del motivo de secuencias, determinación del marco de lectura abierto, llamadas a bases de ácidos nucleicos, análisis del uso de codones, recorte de bases de ácidos nucleicos, y análisis de picos del cromatograma de secuenciación.

## ES 2 333 410 T3

Se proporciona un procedimiento basado en el análisis por ordenador para realizar la identificación de la homología. Este procedimiento comprende las etapas de: proporcionar una primera secuencia de polinucleótidos que comprende la secuencia de un polinucleótido útil en la invención en un medio legible por un ordenador; y comparar dicha primera secuencia de polinucleótidos con al menos una segunda secuencia de polinucleótidos o polipéptidos para identificar la homología.

También se proporciona un procedimiento basado en el análisis por ordenador para realizar la identificación de la homología, dicho procedimiento que comprende las etapas de: proporcionar una primera secuencia de polipéptidos que comprende la secuencia de un polipéptido útil en la invención en un medio legible por un ordenador; y comparar dicha primera secuencia de polipéptidos con al menos una segunda secuencia de polinucleótidos o polipéptidos para identificar la homología.

Todas las publicaciones y referencias, incluyendo pero no limitado a, patentes y solicitudes de patente, citadas en esta memoria descriptiva se incorporan en su totalidad en el presente documento por referencia como si se indicase específica e individualmente que cada publicación o referencia individual se incorpora por referencia en el presente documento como si se hubiese expuesto en su totalidad. Cualquier solicitud de patente a la cual esta solicitud reivindique prioridad también se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia de la manera descrita anteriormente para publicaciones y referencias.

### Definiciones

“Identidad”, como es sabido en la materia, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, según sea el caso, determinada por comparación de las secuencias. En la materia, “identidad” también significa el grado de relación entre las secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, según sea el caso, determinada por el emparejamiento entre cadenas de esas secuencias. La “identidad” se puede calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos, incluyendo, pero no limitado a, aquellos descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988). Los procedimientos para determinar la identidad están diseñados para dar el emparejamiento más grande entre las secuencias probadas. Además, los procedimientos para determinar la identidad están codificados en programas de ordenador disponibles públicamente. Los métodos de los programas de ordenador para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no están limitados a, el programa GAP en el paquete de software GCG (Devereux, J., y col., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN (Altschul, S.F. y col., J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990), y FASTA (Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448 (1988)). La familia de programas BLAST está disponible públicamente en el NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). Para determinar la identidad también se puede usar el conocido algoritmo de Smith Waterman.

Los parámetros para la comparación de secuencias de polinucleótidos incluyen los siguientes:

\* Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)

\* Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)

\* Penalización para los huecos: 8

\* Longitud de la penalización para los huecos: 2

\* Un programa útil con estos parámetros está disponible públicamente como programa “gap” de Genetics Computer Group, Madison WI. Los parámetros anteriormente mencionados son los parámetros por defecto para la comparación de péptidos (junto con la ausencia de penalización para los huecos de los extremos).

Los parámetros para la comparación de polinucleótidos incluyen los siguientes:

\* Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)

\* Matriz de comparación: emparejamientos = +10, desemparejamientos = 0

\* Penalización para los huecos: 50

\* Longitud de la penalización para los huecos: 3

## ES 2 333 410 T3

\* Disponible como: el programa “gap” de Genetics Computer Group, Madison WI. Estos son los parámetros por defecto para la comparación de ácidos nucleicos.

5 En (1) y (2) a continuación se proporciona un significado preferido para “identidad” para polinucleótidos y polipéptidos, según sea el caso.

(1) Formas de realización de polinucleótidos adicionales incluyen un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos una identidad del 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 ó 100% a la secuencia de referencia de SEQ ID NO: 1, en la que dicha secuencia de polinucleótidos puede ser idéntica a la secuencia de referencia de SEQ ID NO: 1 o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de nucleótidos comparada con la secuencia de referencia, en las que dichas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una delección, una sustitución, incluyendo transición o transversión, o una inserción de nucleótidos, y en las que dichas alteraciones se pueden producir en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia, y en las que dicho número de alteraciones de nucleótidos se determina multiplicando el número total de nucleótidos en la SEQ ID NO: 1 por el número entero que define la identidad porcentual dividida por 100 y a continuación restando ese producto de dicho número de nucleótidos total en la SEQ ID NO: 1, o:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

25 en la que  $n_n$  es el número de alteraciones de nucleótidos,  $x_n$  es el número de nucleótidos total en la SEQ ID NO: 1, y es 0,50 para el 50%, 0,60 para el 60%, 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, 0,90 para el 90%, 0,95 para el 95%, 0,97 para el 97% o 1,00 para el 100%, y  $\cdot$  es el símbolo para el operador de la multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de  $x_n$  e  $y$  se redondea hacia abajo hasta el número entero más próximo antes de restarlo de  $x_n$ . Las alteraciones de las secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la SEQ ID NO: 2 pueden crear mutaciones sin sentido, de cambio de sentido o de desplazamiento del marco en esta secuencia codificante y así alterar el polipéptido codificado por el polinucleótido después de esas alteraciones.

A modo de ejemplo, una secuencia de polinucleótidos de la presente invención puede ser idéntica a las secuencias de referencia de la SEQ ID NO: 1, esto es, puede ser 100% idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de ácidos nucleicos comparada con la secuencia de referencia de manera que la identidad porcentual es inferior a una identidad del 100%. Estas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una delección, una sustitución, incluyendo transición y transversión, o una inserción de ácidos nucleicos, y en las que dichas alteraciones se pueden producir en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia de polinucleótidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los ácidos nucleicos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de ácidos nucleicos para una identidad porcentual dada se determina multiplicando el número total de ácidos nucleicos en la SEQ ID NO: 1 por el número entero que define la identidad porcentual dividido por 100 y a continuación restando ese producto de dicho número total de ácidos nucleicos en la SEQ ID NO: 1, o:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

50 en la que  $n_n$  es el número de alteraciones de ácidos nucleicos,  $x_n$  es el número total de ácidos nucleicos en la SEQ ID NO: 1, y es, por ejemplo, 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, etc.,  $\cdot$  es el símbolo para el operador de la multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de  $x_n$  e  $y$  se redondea hacia abajo hasta el número entero más próximo antes de restarlo de  $x_n$ .

(2) Formas de realización de polipéptidos adicionales incluyen un polipéptido aislado que comprende un polipéptido que tiene al menos una identidad del 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 ó 100% a la secuencia de referencia del polipéptido de SEQ ID NO: 2, en la que dicha secuencia de polipéptidos puede ser idéntica a la secuencia de referencia de SEQ ID NO: 2 o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos comparada con la secuencia de referencia, en las que dichas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una delección, una sustitución, incluyendo una sustitución conservativa y no conservativa, o una inserción de aminoácidos, y en las que dichas alteraciones se pueden producir en las posiciones amino- o carboxi-terminal de la secuencia de polipéptidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia, y en las que dicho número de alteraciones de aminoácidos se determina multiplicando el número total de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2 por el número entero que define la identidad porcentual dividida por 100 y a continuación restando ese producto de dicho número total de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2, o:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

## ES 2 333 410 T3

en la que  $n_a$  es el número de alteraciones de aminoácidos,  $x_a$  es el número total de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2, y es 0,50 para el 50%, 0,60 para el 60%, 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, 0,90 para el 90%, 0,95 para el 95%, 0,97 para el 97% o 1,00 para el 100%, y  $\cdot$  es el símbolo para el operador de la multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de  $x_a$  e  $y$  se redondea hacia abajo hasta el número entero más próximo antes de restarlo de  $x_a$ .

A modo de ejemplo, una secuencia de polipéptidos de la presente invención puede ser idéntica a las secuencias de referencia de la SEQ ID NO: 2, esto es, puede ser 100% idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos comparada con la secuencia de referencia de manera que la identidad porcentual es inferior a una identidad del 100%. Estas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una delección, una sustitución, incluyendo una sustitución conservativa y no conservativa, o una inserción de aminoácidos, y en las que dichas alteraciones se pueden producir en las posiciones amino- o carboxi-terminal de la secuencia de polipéptidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia. El número de alteraciones de aminoácidos para una identidad porcentual dada se determina multiplicando el número total de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2 por el número entero que define la identidad porcentual dividido por 100 y a continuación restando ese producto de dicho número total de ácidos nucleicos en la SEQ ID NO: 2, o:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

en la que  $n_a$  es el número de alteraciones de aminoácidos,  $x_a$  es el número total de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2, y es, por ejemplo, 0,70 para el 70%, 0,80 para el 80%, 0,85 para el 85%, etc., y  $\cdot$  es el símbolo para el operador de la multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de  $x_a$  e  $y$  se redondea hacia abajo hasta el número entero más próximo antes de restarlo de  $x_a$ .

“Individuo(s)”, cuando se usa en el presente documento en referencia a un organismo, significa un eucariota multicelular, incluyendo, pero no limitado a, un metazoo, un mamífero, un óvulo, un bóvido, un simio, un primate, y un ser humano.

“Aislado” significa alterado “por la mano del hombre” de su estado natural, es decir, si se encuentra en la naturaleza, se ha cambiado o se ha extraído de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido presente de manera natural en un organismo vivo no está “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales con los que coexiste en su estado natural está “aislado”, según el término que se emplea en el presente documento. Además, un polinucleótido o polipéptido que se introduce en un organismo por transformación, manipulación genética o mediante cualquier otro procedimiento recombinante está “aislado”, incluso si aún se encuentra presente en dicho organismo, cuyo organismo puede estar vivo o no vivo.

“Polinucleótido(s)” generalmente se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado, incluyendo regiones de cadena sencilla y de doble cadena.

“Variante” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia, pero que retiene sus propiedades esenciales. Una variante típica de un polinucleótido difiere de otro polinucleótido de referencia en la secuencia de nucleótidos. Los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden alterar, o no, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios de nucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, delecciones, fusiones y rupturas de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se describe a continuación. Generalmente, las diferencias son limitadas, de manera que las secuencias del polipéptido de referencia y de la variante son globalmente muy similares y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, adiciones, delecciones, en cualquier combinación. Un residuo aminoácido sustituido o insertado puede estar codificado, o no, por el código genético. Una variante de un polinucleótido o un polipéptido puede ser de origen natural tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe si se encuentra en la naturaleza. Las variantes de polinucleótidos y polipéptidos que no son de origen natural se pueden preparar por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

“Enfermedad(es)” significa cualquier enfermedad causada por o relacionada con una infección por una bacteria, incluyendo, por ejemplo, otitis media en párvulos y niños, neumonía en personas mayores, sinusitis, infecciones nosocomiales y enfermedades invasivas, otitis media crónica con pérdida de la audición, acumulación de fluidos en el oído medio, daño del nervio auditivo, aprendizaje retrasado del habla, infección del tracto respiratorio superior e inflamación del oído medio.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se llevaron a cabo usando técnicas habituales, que son muy conocidas y rutinarias por aquellos expertos en la materia, excepto donde se describa en detalle otra cosa. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

## ES 2 333 410 T3

### Ejemplo 1

*Secuenciación de ADN del gen BASB203 a partir de la cepa 3224A de Haemophilus influenzae no tipificable*

5 A: *BASB203 en la cepa 3224A de Haemophilus influenzae no tipificable*

La secuencia de ADN del polinucleótido BASB203 de la cepa 3224A de *Haemophilus influenzae* no tipificable (también denominada cepa ATCC PT-1816) se muestra en la SEQ ID NO: 1. La traducción de la secuencia de polinucleótidos BASB203 se muestra en la SEQ ID NO: 2.

10

B: *BASB203 en la cepa 3224A de Haemophilus influenzae no tipificable*

15 La secuencia del polinucleótido BASB203 se confirmó en la cepa 3224A de *Haemophilus influenzae* no tipificable. Para este propósito, ADN plasmídico (véase ejemplo 3A) que contiene la región génica que codifica BASB203 de la cepa 3224A de *Haemophilus influenzae* no tipificable se sometió a secuenciación de ADN usando el kit Big Dyes (Applied biosystems) y se analizó en un secuenciador de ADN ABI 373/A en las condiciones descritas por el fabricante usando los cebadores NTNS1poli 1 (5'-TC ATG AAA GGA AAA ATC ACC-3') [SEQ ID NO: 12] y NTNS1poli2 (5'-AGA TCT ATT CAA ATA ATA GCG AAT -3') [SEQ ID NO: 13] específicos para el polinucleótido BASB203 y el cebador de secuencia universal M13 (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') [SEQ ID NO: 14] y el cebador de secuencia inversa M13 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') [SEQ ID NO: 15] específicos para el vector. Como resultado, se obtuvo el polinucleótido y las secuencias de polipéptidos deducidas, respectivamente. Usando el programa Clustalx 1.8, la secuencia de polinucleótidos se alineó con la SEQ ID NO: 1; una comparación de identidades de pares demostró que la secuencia de polinucleótidos era un 100% idéntica a la SEQ ID NO: 1 a lo largo de su longitud completa. Usando el mismo programa Clustalx 1.8, la secuencia de polipéptidos se alineó con la SEQ ID NO: 2; una comparación de identidades de pares demostró que la secuencia de polipéptidos era un 100% idéntica a la SEQ ID NO: 2 a lo largo de su longitud completa.

30 Ejemplo 2

*Análisis de la variabilidad del gen BASB203 entre cepas de Haemophilus influenzae no tipificable*

35 Se extrajo ADN genómico de cuatro cepas más de *Haemophilus influenzae* no tipificable (presentadas en la Tabla 1) como sigue. Un Erlenmeyer de 500 ml que contiene ~100 ml de caldo BHI se inoculó con el cultivo de siembra y se creció durante ~12-16 horas a 37°C en una incubadora con agitación, ~175 rpm, para generar una masa de células para el aislamiento del ADN. Las células se recogieron por centrifugación en un rotor Sorvall GSA a ~2000 X g durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante. El ADN genómico se extrajo del sedimento de las células de *Haemophilus influenzae* NT usando el kit de extracción de ADN genómico QIAGEN (Qiagen GmbH). 1 µg de este material se sometió a amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa usando los cebadores MCM007 (5'- CGT GAA TAA GTT TAA ATA ACT GG-3') [SEQ ID NO: 16] y MCM008 (5'- TCC TAA TTT GTT GGA AAA TCT TTA-3') [SEQ ID NO: 17]. Este producto de la PCR se purificó usando el kit de purificación del producto de la PCR de alta pureza (Roche), se sometió a secuenciación del ADN usando el kit Big Dyes (Applied biosystems) y se analizó en un analizador genético ABI PRISM 310 por medio de los cebadores MCM007 [SEQ ID NO: 16] y MCM008 [SEQ ID NO: 17] en las condiciones descritas por el fabricante. Usando el programa Clustalx 1.8, se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias de polinucleótidos, y se presenta en la Figura 1. Una comparación de identidades de pares demostró que las secuencias de polinucleótidos SEQ ID NO: 3, 5, 7 y 9 resultaron ser entre un 97 y un 100% idénticas a la SEQ ID NO: 1 (Tabla 2). Usando el programa Clustalx 1.8, se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias de polipéptidos, y se presenta en la Figura 2. Una comparación de identidades de pares demostró que las secuencias de polipéptidos SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10 resultaron ser entre un 96 y un 100% idénticas a la SEQ ID NO: 2 (Tabla 3).

55

60

65

# ES 2 333 410 T3

TABLA 1

*Características de las cepas de Haemophilus influenzae NT usadas en este estudio*

5

10

15

20

25

Cepa	aislada en	de	secuencia de nucleótidos	secuencia de péptidos
3224A o ATCC PTA-1816	EE.UU.	Otitis media	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2
810956	H	Meningitis	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
27W116791N1	DM	Fibrosis cística	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
A860514	H	Bronquitis crónica	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
A840164	H	Cepa portadora	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10

30

TABLA 2

*Comparación de pares de secuencias de polinucleótidos*

35

40

45

50

55

60

65

	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 1		97	98	99	98
SEQ ID NO: 3			98	97	97
SEQ ID NO: 5				96	97
SEQ ID NO: 7					98
SEQ ID NO: 9					

## ES 2 333 410 T3

TABLA 3

*Comparación de pares de secuencias de polipéptidos*

	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 10
5					
10	SEQ ID NO: 2	97	97	100	97
15	SEQ ID NO: 4		99	97	96
20	SEQ ID NO: 6			97	96
25	SEQ ID NO: 8				97
	SEQ ID NO: 10				

### 30 Ejemplo 3

*Construcción de un plásmido para expresar BASB203 recombinante*

#### A: Clonación de BASB203

35 Los sitios de restricción BspHI y BglII introducidos en los cebadores de amplificación directo NTNS1poli (5'-TC ATG AAA GGA AAA ATC ACC-3') [SEQ ID NO: 12] e inverso NTNSIpoli2 (5'-AGA TCT ATT CAA ATA ATA GCG AAT -3') [SEQ ID NO: 13], respectivamente, permitieron la clonación direccional del producto de la PCR en el plásmido de expresión pQE60 de *E. coli*, de manera que la proteína BASB203 se pudo expresar en forma de proteína de fusión que contiene el marcador (His)<sub>6</sub> en el C-término para cromatografía de afinidad. El producto de la PCR BASB203 primero se introdujo en el vector de clonación pCRIITOPO (*In vitro* gen) usando células bacterianas Top10, según las instrucciones del fabricante. Esta construcción intermedia se realizó para facilitar la clonación posterior en un vector de expresión. Los transformantes que contienen el inserto de ADN de BASB203 se seleccionaron por análisis con enzimas de restricción. Después de la digestión, se analizó una alícuota de la reacción de ~20 µl por electroforesis en gel de agarosa (0,8% de agarosa en un tampón Tris-acetato-EDTA (TAE)). Los fragmentos de ADN se visualizaron por iluminación UV después de la electroforesis en gel y por tinción con bromuro de etidio. Junto con las muestras de prueba también se sometió a electroforesis en paralelo a un patrón de tamaños moleculares de ADN (escalera de 1 Kb, Life Technologies) y se usó para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN. El plásmido purificado a partir de los transformantes seleccionados a continuación se digirió secuencialmente con las enzimas de restricción BspHI y BglII hasta su completamiento según lo recomendado por el fabricante (Life Technologies). A continuación el fragmento de ADN digerido se purificó usando columnas centrífugas basadas en gel de sílice antes de la ligación al plásmido pQE60.

#### 55 B: Producción del vector de expresión

60 Para preparar el plásmido de expresión pQE60 para la ligación, éste se digirió de manera similar con NcoI y BglII hasta su completamiento. Para programar la reacción de ligación se usó un exceso molar de 5 veces aproximadamente de fragmentos digeridos a vector preparado. Se realizó una reacción de ligación habitual en ~20 µl (~16°C, ~16 horas), usando procedimientos muy conocidos en la materia, y la ADN ligasa de T4 (~2,0 unidades/reacción, Life Technologies). Se usó una alícuota de la ligación (~5 µl) para transformar células electro-competentes M15(pREP4) según procedimientos muy conocidos en la materia. Después de un periodo de extensión de ~2-3 horas a 37°C en ~1,0 ml de caldo LB, las células transformadas se cultivaron en placas de agar LB que contienen ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (30 µg/ml). El antibiótico se incluyó en la selección. Las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C durante ~16 horas. Se tomaron colonias ApR/KanR individuales con palillos estériles y se usaron para "parchear" placas LB ApR/KanR con inoculado fresco así como ~1,0 ml de caldo de cultivo LB Ap/Kan. Tanto las placas parcheadas como el cultivo en caldo se incubaron durante toda la noche a 37°C en una incubadora normal (placas) o en un baño de agua en agitación. Se empleó un análisis de PCR basado en células completas para verificar

## ES 2 333 410 T3

que los transformantes contenían el inserto de ADN BASB203. Aquí, el ~1,0 ml de caldo de cultivo LB Ap/Kan incubado durante toda la noche se transfirió a un tubo de polipropileno de 1,5 ml y las células se recogieron por centrifugación en una microcentrifuga Beckmann (~3 min., temperatura ambiente, ~12.000 X g). El sedimento celular se suspendió en ~200  $\mu$ l de agua estéril y se usó una alícuota de ~10  $\mu$ l para programar una reacción de PCR con un volumen final de ~50  $\mu$ l que contiene los cebadores de amplificación directa e inversa de BASB203. La etapa de desnaturalización inicial a 95°C se incrementó a 3 minutos para asegurar la ruptura térmica de las células bacterianas y la liberación del ADN plasmídico. Se usó un termociclador ABI Modelo 9700 y un perfil de amplificación térmica en tres etapas y 32 ciclos, es decir, 95°C, 45 s; 55-58°C, 45 s, 72°C, 1 min., para amplificar el fragmento BASB203 procedente de las muestras transformantes lisadas. Después de la amplificación térmica, se analizó una alícuota de la reacción de ~20  $\mu$ l por electroforesis en gel de agarosa (0,8% de agarosa en un tampón Tris-acetato-EDTA (TAE)). Los fragmentos de ADN se visualizaron por iluminación UV después de la electroforesis en gel y la tinción con bromuro de etidio. Junto con las muestras de prueba también se sometió a electroforesis en paralelo a un patrón de tamaños moleculares de ADN (escalera de 1 Kb, Life Technologies) y se usó para estimar el tamaño de los productos de la PCR. Los transformantes que produjeron el producto de la PCR del tamaño esperado se identificaron como cepas que contienen una construcción de expresión de BASB203. A continuación las cepas que contienen el plásmido de expresión se analizaron para la expresión inducible de BASB203 recombinante.

### C: Análisis de expresión de transformantes PCR-positivos

Una alícuota del cultivo de siembra incubando durante toda la noche (~1,0 ml) se inoculó en un Erlenmeyer de 125 ml que contiene ~25 ml de caldo LB Ap/Kan y se creció a 37°C con agitación (~250 rpm) hasta que la turbidez del cultivo alcanzó una  $DO_{600}$  de ~0,5, es decir, mitad de la fase logarítmica (normalmente 1,5-2,0 horas aproximadamente). En ese momento aproximadamente la mitad del cultivo (~12,5 ml) se transfirió a un segundo matraz de 125 ml y se indujo la expresión de proteína BASB203 recombinante con la adición de IPTG (disolución madre 1,0 M preparada en agua estéril, Sigma) hasta una concentración final de 1,0 mM. La incubación de ambos cultivos inducido por IPTG y no inducido por IPTG se prosiguió durante ~4 horas más a 37°C con agitación. Las muestras (~1,0 ml) de ambos cultivos inducido y no inducido se retiraron después del periodo de inducción y las células se recogieron por centrifugación en una microcentrifuga a temperatura ambiente durante ~3 minutos. Los sedimentos celulares individuales se suspendieron en ~50  $\mu$ l de agua estéril, a continuación se mezclaron con un volumen igual de tampón de muestra 2X Laemelli SDS-PAGE que contiene 2-mercaptoetanol, y se pusieron en un baño de agua hirviendo durante ~3 minutos para desnaturalizar las proteínas. Se cargaron volúmenes iguales (~15  $\mu$ l) tanto de los lisados celulares en bruto inducidos por IPTG como no inducidos sobre un duplicado de un gel de poliacrilamida con el 12% de Tris/glicina (Mini-gel de 1 mm de grosor, Novex). Las muestras del lisado inducido y no inducido se sometieron a electroforesis junto con marcadores de pesos moleculares preteñidos (SeeBlue, Novex) en condiciones convencionales usando un tampón de carrera de SDS/Tris/glicina normal (BioRad). Después de la electroforesis, un gel se tiñó con azul brillante de coomassie R250 (BioRad) y a continuación se destiñó para visualizar nuevas proteína(s) BASB203 inducibles por IPTG. El segundo gel se sometió a electrotransferencia sobre una membrana de PVDF (tamaño de poro 0,45  $\mu$ m, Novex) durante ~2 horas a 4°C usando el aparato de transferencia BioRad Mini-Protein II y el tampón de transferencia metanol de Towbin (20%). El bloqueo de la membrana y las incubaciones con anticuerpos se realizaron según procedimientos muy conocidos en la materia. Se usó un anticuerpo monoclonal anti-RGS (His) 3, seguido de un segundo anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado a HRP (QiaGen), para confirmar la expresión e identidad de la proteína recombinante BASB203. La visualización del patrón reactivo al anticuerpo anti-His se consiguió usando un sustrato insoluble ABT o usando Hyperfilm con el sistema de quimioluminiscencia Amersham ECL.

### Ejemplo 4

#### 50 Producción de BASB203 recombinante

##### Cepa bacteriana

Se usó una cepa de expresión recombinante de *E. coli* M15(pREP4) que contiene un plásmido(pQE60) que codifica BASB203 en *Haemophilus influenzae* NT para producir una masa celular para la purificación de proteína recombinante. La cepa de expresión se cultivó sobre placas de agar LB que contienen 100  $\mu$ g/ml de ampicilina ("Ap") y 30  $\mu$ g/ml de kanamicina ("Km") para asegurar que se mantenían el pQE60 y el pREP4. Para la criopreservación a -80°C, la cepa se propagó en caldo LB que contiene la misma concentración de antibióticos, y a continuación se mezcló con un volumen igual de caldo LB que contiene el 30% de glicerol (p/v).

##### Medio

El medio de crecimiento usado para la producción de proteína recombinante consistía en caldo LB (Difco) que contenía 100  $\mu$ g/ml de Ap y 30  $\mu$ g/ml de Km. Para inducir la expresión de proteína recombinante BASB203, se añadió IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) al cultivo (1 mM, final).

## ES 2 333 410 T3

### Fermentación

Un matraz Erlenmeyer de siembra de 100 ml, que contiene 10 ml de volumen operativo, se inoculó con 0,3 ml de cultivo congelado descongelado rápidamente, o varias colonias procedentes de un cultivo selectivo de una placa de agar, y se incubó durante 12 horas aproximadamente a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  sobre una plataforma de agitación a 150 rpm (Innova 2100, New Brunswick Scientific). A continuación este cultivo de siembra se usó para inocular un Erlenmeyer con un volumen operativo de 500 ml que contiene caldo LB y los antibióticos Ap y Km. Al Erlenmeyer se le añadió IPTG (disolución madre 1,0 M, preparada en agua estéril) cuando el cultivo alcanzó el crecimiento semi-logarítmico ( $\text{DO}_{600}$  de  $\sim 0,5$  unidades). Las células se indujeron durante 4 horas y a continuación se recogieron por centrifugación usando una centrífuga 28RS Heraeus (Sepatech) o RC5C superspeed (Sorvall Instruments). La pasta de células se almacenó a  $\sim 20^\circ\text{C}$  hasta que fue procesada.

### Productos químicos y materiales

Se adquirió imidazol y Triton X-100 en Merck. Se obtuvo clorhidrato de guanidina en Fluka. La aprotinina se obtuvo en Sigma Chemical Company. La urea y el AEBSF eran de ICN-Biochemicals. Todos los otros productos químicos eran de grado reactivo o mejor.

La resina Ni-NTA Superflow y el anticuerpo Penta-His exento de BSA se obtuvieron en QiaGen. El ensayo MicroBCA se obtuvo en Pierce; los filtros de Amicon 3 en Millipore. Las membranas de diálisis (MWCO12-140) eran de MFPI, EE.UU. El marcador de pesos moleculares (escalera BenchMark) era de Life-technologies.

### Ejemplo 5

#### Purificación de BASB203 recombinante de *E. coli*

##### Extracción-purificación

La pasta de células procedente de 250 ml de cultivo inducido por IPTG ( $\sim 4$  horas,  $\text{DO}_{620} = 0,5$ ) se resuspendió en 20 ml de tampón fosfato a pH 7,5 que contiene AEBSF 1 mM y aprotinina 1 mM como inhibidores de proteasas. Las células se lisaron en un disruptor celular. El lisado se centrifugó a 27.000 g durante 20 minutos. El sedimento se lavó una vez con tampón fosfato a pH 7,5 y se centrifugó de nuevo a 27.000 g durante 20 minutos. El sedimento se suspendió en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, tampón Tris-HCl 10 mM a pH 8 que contiene cloruro de guanidinio 6 M (tampón A) y se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente. El extracto total se centrifugó a 27.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con la resina Ni-NTA superflow equilibrada en tampón A. La resina se lavó dos veces con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, tampón Tris-HCl 10 mM a pH 6,3, que contiene urea 8 M (tampón B). La elución se llevó a cabo sucesivamente con tampón B ajustado a pH 5,9 y a continuación a pH 4,5. Las fracciones que contenían la proteína BASB203 se neutralizaron con el 25% en volumen de tampón fosfato 0,2 M a pH 7,5. Las fracciones reunidas se dializaron sucesivamente frente a  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM que contiene urea 8 M, a continuación urea 4 M, a continuación urea 2 M y finalmente frente a PBS a pH 7,4 que contiene el 0,1% de Triton X-100.

La proteína BASB203 purificada se cuantificó usando un reactivo de ensayo Micro BCA. Se obtuvieron 2,0 mg de proteína purificada, a una concentración final de  $190 \mu\text{g/ml}$ .

Como se muestra en la figura 3-A, la proteína BASB203 purificada aparece en el análisis SDS-PAGE como una banda principal que migra en torno a los 20 kDa (masas moleculares relativas estimadas). La pureza se estimó por encima del 90%. La proteína BASB203 era reactiva contra un anticuerpo monoclonal de ratón crecido contra el motivo 6-Histidina (figura 3-B).

### Ejemplo 6

#### Producción de antisuero para BASB203 recombinante

Se generó antisuero polivalente dirigido contra la proteína BASB203 vacunando a conejos con la proteína BASB203 recombinante purificada. También se generó antisuero polivalente dirigido contra la proteína BASB203 vacunando a ratones con la proteína BASB203 recombinante purificada. Los animales se sangraron antes de la primera inmunización ("pre-sangrado") y después de la última inmunización.

Se midieron los títulos anti-proteína BASB203 por ELISA usando proteína BASB203 recombinante purificada como antígeno de recubrimiento. El título se define como los títulos del punto medio calculados mediante el modelo logístico de 4 parámetros usando el software XL Fit. También se usó el antisuero como primer anticuerpo para identificar la proteína en una transferencia de Western como se describe en el ejemplo 9 a continuación.

## ES 2 333 410 T3

### Ejemplo 7

*Eficacia de la vacuna BASB203: aumento del aclaramiento pulmonar de Haemophilus influenzae no tipificable (NTHi) en ratones*

5

Este modelo en ratón se basa en el análisis de la invasión pulmonar por NTHi en ratones vacunados después de una exposición intranasal normal.

10 Grupos de 6 ratones BALB/c (hembras, 6 semanas de edad) se inmunizaron subcutáneamente con 100  $\mu$ l de vacuna correspondiente a una dosis de 10  $\mu$ g y se les administró una dosis de refuerzo 2 semanas más tarde. Una semana después de la dosis de refuerzo, los ratones se expusieron por instilación de 50  $\mu$ l de suspensión bacteriana ( $5 \times 10^5$  CFU/50  $\mu$ l) en la fosa nasal izquierda con anestesia (los ratones se anestesiaron con una combinación de los anestésicos ketamina y xilacina, 0,24 mg de xilacina (Rompun) y 0,8 mg de ketamina (Imalgene)/100  $\mu$ l). Los ratones se sacrificaron 0,5, 6 y 24 horas después de la exposición y los pulmones se extrajeron asépticamente y se homogeneizaron individualmente. Se determinó el log 10 del número medio ponderado de CFU/pulmón contando las colonias que crecen sobre placas de agar GC después del cultivo en placa de 20  $\mu$ l de 5 diluciones seriadas de homogeneizado. Se calculó para cada grupo la media aritmética del log 10 del número medio ponderado de CFU/pulmón y las desviaciones estándar.

20 Los resultados se analizaron estadísticamente aplicando el análisis ANOVA de 1 vía después de asumir la igualdad de la varianza (comprobada por la prueba de Brown y Forsythe) y la normalidad (comprobada usando la prueba de Shapiro-Wilk). Las diferencias entre los grupos se analizaron usando la prueba de rangos de Tukey tratada como Student (HSD).

25 En este experimento se inmunizaron grupos de ratones con proteína BASB203 adsorbida sobre  $\text{AlPO}_4$  (10  $\mu$ g de proteína BASB203 sobre 100  $\mu$ g de  $\text{AlPO}_4$ ) o con una preparación de células enteras muertas (kwc) de la cepa 3224A de NTHi absorbida sobre  $\text{AlPO}_4$  ( $5 \times 10^8$  células sobre 100  $\mu$ g de  $\text{AlPO}_4$ ) o con 100  $\mu$ g de  $\text{AlPO}_4$  sin antígeno. Los ratones se expusieron a  $5 \times 10^5$  CFU de la cepa 3224A de la bacteria NTHi viva.

30 Se calculó el log 10 del número medio ponderado de CFU/pulmón y la desviación estándar para cada grupo 0,5, 6 y 24 horas después de la exposición. Los ratones inmunizados Sham tenían un log 10 CFU/pulmones de 6,31 (+/- 0,13) y 3,96 (+/- 0,20) 6 y 24 horas después de la exposición, respectivamente.

35 La preparación kwc indujo un aclaramiento pulmonar significativo comparado con el grupo control, 6 horas (diferencia de 0,81 unidades log,  $p = 0,0000$ ) y 24 horas (diferencia de 1,18 unidades log,  $p = 0,0000$ ) y 24 horas después de la exposición. La vacuna BASB203 indujo una diferencia significativa de 0,62 unidades log (+/- 0,16,  $p = 0,0003$ ) y 1,10 unidades log (+/- 0,27,  $p = 0,0000$ ) en el aclaramiento pulmonar comparada con el grupo control 6 y 24 horas después de la exposición, respectivamente.

40

### Ejemplo 8

*Caracterización inmunológica: Exposición superficial de BASB203*

45 Se generó suero anti-BASB203 por inmunización subcutánea de 18 ratones BALB/c (hembras, 6 semanas de edad) con 100  $\mu$ l de vacuna correspondiente a 10  $\mu$ g de dosis y se les administró una dosis de refuerzo 2 semanas más tarde. Los títulos anti-proteína BASB203 se determinaron por un ELISA usando células completas muertas con formalina de cepas 3224A de NTHi (20  $\mu$ g/pocillo). El título se define como los títulos en el punto medio calculados mediante el modelo logístico de 4 parámetros usando el software SoftMax Pro.

50

Los títulos observados con el suero de ratones inmunes eran 11 veces más elevados que el suero correspondiente a ratones pre-inmunizados y demuestra que la proteína BASB203 se detecta en la superficie de células NTHi.

### 55 Ejemplo 9

*Caracterización inmunológica: Análisis de transferencia de Western*

60 Varias cepas de NTHi, así como aislados clínicos, se crecieron en placas de agar Chocolate durante 24 horas a 36°C y el 5% de  $\text{CO}_2$ . Se usaron varias colonias para inocular el caldo Brain Heart Infusion (BHI) suplementado con NAD y hemina, cada una a 10  $\mu$ g/ml. Los cultivos se crecieron hasta que la absorbancia a 620 nm es de 0,4 aproximadamente y las células se recogieron por centrifugación. A continuación las células se concentraron y se solubilizaron en tampón de muestra PAGE. A continuación las células solubilizadas se resolvieron sobre geles de poliacrilamida al 4-20% y las proteínas separadas se transfirieron electroforéticamente a membranas de PVDF. A continuación las membranas de PVDF se pretratan con tampón de saturación. Todas las incubaciones posteriores se llevan a cabo usando el tampón de pretratamiento.

65

## ES 2 333 410 T3

Las membranas de PVDF se incubaron con suero preinmune o suero inmune de conejo o ratón. A continuación las membranas de PVDF se lavaron.

5 Las membranas de PVDF se incubaron con Ig de oveja anti-conejo o ratón marcada con biotina. A continuación las membranas de PVDF se lavaron 3 veces con tampón de lavado, y se incubaron con estreptavidina-peroxidasa. A continuación las membranas de PVDF se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se revelaron con 4-cloro-1-naftol.

### Ejemplo 10

10

#### *Caracterización inmunológica: Actividad bactericida*

15 Se examinó la actividad citotóxica mediada por el complemento de anticuerpos anti-BASB203 para determinar el potencial como vacuna del antisuero de proteína BASB203 que se prepara como se ha descrito anteriormente. Se examinaron las actividades del suero pre-inmune y del antisuero anti-BASB203 en la muerte de NTHi mediada por el complemento.

20 Se crecieron en placas cepas de NTHi. Se añadieron varias colonias al medio de cultivo. Los cultivos se crecieron y se recogieron hasta que la  $A_{620}$  es de 0,4 aproximadamente. Después de una etapa de lavado, el sedimento se suspendió y se diluyó.

25 El suero preinmune y el suero anti-BASB203 se depositaron en el primer pocillo de una placa de 96 pocillos y se depositaron diluciones seriadas en los otros pocillos de la misma fila. Posteriormente se añadió NTHi diluido vivo y la mezcla se incubó. Se añadió complemento a cada pocillo a una dilución de trabajo definida de antemano en un ensayo de toxicidad.

30 Cada prueba incluye un control del complemento (pocillos sin suero que contienen una fuente de complemento activa o inactiva), un control positivo (pocillos que contienen suero con un título conocido de anticuerpos bacterianos), un control del cultivo (pocillos sin suero y complemento) y un control del suero (pocillos sin complemento).

Se midió la actividad bacteriana de antisuero de conejo o ratón (muerte del 50% de la cepa homóloga).

### Ejemplo 11

35

#### *Presencia de anticuerpo para BASB203 en suero convaleciente humano*

40 Se realizó el análisis de transferencia de Western de BASB203 recombinante purificada como se describe en el Ejemplo 5 anterior, excepto que se usó suero humano procedente de niños infectados por NTHi como primera preparación de anticuerpos.

### Ejemplo 12

#### *Inhibición de la adhesión de NTHi sobre células mediante antisuero anti-BASB203*

Este ensayo mide la capacidad de suero anti-BASB203 para inhibir la adhesión de bacterias NTHi a células epiteliales. Esta actividad podría evitar la colonización de la nasofaringe por parte de NTHi.

50 Un volumen de bacterias se incubó en hielo con un volumen de una dilución de suero pre-inmune o inmune anti-BASB203. Posteriormente la mezcla se añadió a los pocillos de una placa de 24 pocillos que contiene un cultivo de células confluentes que se lavó una vez con medio de cultivo para eliminar las trazas de antibiótico. La placa se centrifugó y se incubó.

55 A continuación cada pocillo se lavó con suavidad. Después del último lavado, se añadió glicocolato sódico a los pocillos. Después de la incubación, la capa de células se raspó y se homogeneizó. Las diluciones de los homogeneizados se pusieron en placas de agar y se incubaron. Se contó el número de colonias de cada placa y se calculó el número de bacterias presentes en cada pocillo.

60

### Ejemplo 13

#### *Epítomos útiles*

65 Los epítomos de células B de una proteína están localizados principalmente en su superficie. Para predecir los epítomos de células B del polipéptido BASB203 se combinaron dos procedimientos: predicción de la estructura bidimensional y predicción del índice antigénico. La predicción de la estructura bidimensional se realizó usando el programa PSIPRED (de David Jones, Brunel Bioinformatics Group, Dept. Biological Sciences, Brunel University,

## ES 2 333 410 T3

Uxbridge UB8 3PH, RU) (Fig.4). El índice antigénico se calculó en base al procedimiento descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4:181-186 [1988]). Los parámetros usados en este programa son el índice antigénico y la longitud mínima para un péptido antigénico. Como umbral para el programa se usó un índice antigénico de 0,9 para un mínimo de 5 aminoácidos consecutivos. Los péptidos que comprenden buenos epítopos potenciales de células B se listan en la tabla 4. Estos pueden ser útiles (preferentemente conjugados o unidos de manera recombinante a una proteína más grande) en una composición de vacuna para la prevención de infecciones por NTHi, como lo pueden ser péptidos similares que comprenden mutaciones conservativas (preferentemente un 70, 80, 95, 99 ó 100% idénticos a las secuencias de la tabla 4) o truncados que comprenden 5 o más (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 15) aminoácidos a partir de ellos o extensiones que comprenden por ejemplo, 1, 2, 3, 5, 10 aminoácidos adicionales en cualquiera o en ambos extremos del contexto nativo del polipéptido BASB203 que preserva un epítipo eficaz que puede desencadenar una respuesta inmunitaria en un hospedador frente al polipéptido BASB203.

TABLA 4

*Epítopos potenciales de células B de la SEQ ID NO: 2*

Posición	Secuencia
24	KGLEKER
35	SYREISPQDL
104	ENLKER
126	EQADY
146	STTYDYPTDDWDEDDW
163	FFRWRH

Los epítopos de células T ayudantes son péptidos unidos a moléculas del HLA de clase II y reconocidos por células T ayudantes. La predicción de epítopos de células T ayudantes útiles del polipéptido BASB203 se basa en el procedimiento TEPITOPE descrito por Sturniolo y col. (Nature Biotech. 17: 555-561 [1999]). Los péptidos que comprenden buenos epítopos potenciales de células T se listan en la tabla 5. Estos pueden ser útiles (preferentemente conjugados a péptidos, polipéptidos o polisacáridos) con el propósito de vacunas, como lo pueden ser péptidos similares que comprenden mutaciones conservativas (preferentemente un 70, 80, 95, 99 ó 100% idénticos a las secuencias siguientes) o truncados que comprenden 5 o más (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, ó 20) aminoácidos a partir de ellos o extensiones que comprenden por ejemplo, 1, 2, 3, 5, 10 aminoácidos adicionales en cualquiera o en ambos extremos del contexto nativo del polipéptido BASB203 que preserva un epítipo de células T ayudantes eficaz del polipéptido BASB203.

TABLA 5

*Epítopos potenciales de células T ayudantes de la SEQ ID NO: 2*

Posición	Secuencia
1	MKGKITLFFFTALCFGLTGCIAPPK
34	NSYREISPQDLTC
49	KTVRLGGKIINTTVLANQTKIEVLSLPVSSIS A
85	VELQSDGRFIVYFNGFVEPENLKERY
108	ERYITVGGQLAGT
132	YPWQADKYRIWTLSTTYDYPT
159	DDWGFFRWRHRPWYVQPEIRYYLN

## ES 2 333 410 T3

Todas las regiones identificadas que contienen epítomos como se han definido anteriormente son con respecto a la SEQ ID NO: 2. Las regiones correspondientes en la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10 como se definen por la posición en la tabla 4 y 5 con respecto a la SEQ ID NO: 2 y por su péptido correspondiente en el alineamiento de la figura 2 para la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10 también son péptidos preferidos útiles en la invención como se describe en este ejemplo.

5

### *Materiales depositados*

Un depósito de la cepa 3 (cepa 3224A) ha sido depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) el 5 de Mayo de 2000 y se le asignó el número de depósito PTA-1816.

El depósito cepa de *Haemophilus influenzae* no tipificable se denomina en el presente documento como “la cepa depositada” o como “el ADN de la cepa depositada”.

15 La cepa depositada contiene un gen BASB203 de longitud completa.

La secuencia de polinucleótidos contenida en la cepa depositada, así como la secuencia de aminoácidos de cualquier polipéptido codificada por ellos, están controladas en caso de cualquier conflicto con cualquier descripción de las secuencias en el presente documento.

20

El depósito de la cepa depositada se ha realizado bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para fines de procedimientos de patente. La cepa depositada será liberada al público irrevocablemente y sin restricción o condición tras la emisión de una patente. La cepa depositada se proporciona meramente para comodidad de aquellos expertos en la materia y no es una admisión de que es necesario un depósito para su habilitación, tal como se requiere atender del 35 U.S.C. § 112. Puede ser necesaria una licencia para preparar, usar o vender la cepa depositada, y los compuestos derivados de ella, y por la presente no se garantiza dicha licencia.

25

### 30 **Información de las secuencias**

#### *Secuencias de polinucleótidos y polipéptidos BASB203*

SEQ ID NO: 1 de la secuencia de polinucleótidos de BASB203

35

ATGAAAGGAAAAATCACCTTATTTTTTACCGCACTTTGTTTTGGATTAACGGGCTGTATT  
40 GCACCACCAAAGGGTTAGAAAAGAGCGATTCTCAATTAATTCCTATCGCGAGATTTCT  
CCTCAGGATTTGACCTGTCATTGTAAAACAGTTCGACTTGGAGGAAAATTATCAATACT  
ACCGTTTTAGCAAATCAAACAAAAATGAAGTGTTAAGTTTACCCGTATCATCAATTTCA  
45 GCTAAACCATTTGTTGAATTGCAATCCGATGGTCGCTTTATCGTGTATTTCAACGGTTTT  
GTTGAGCCTGAAAATTTAAAAGAACGTTATATTACTGTAGGTGGTCAATTAGCTGGAACA  
GAGAAAGGCAAAATAGAACAAGCTGATTATACTTATCCTGTTGTTCAAGCGGATAAATAC  
CGTATTTGGACACTCAGTACCACCTATGATTATCCAACAGATGATTGGGATGAAGATGAT  
50 TGGGGATTTTTTAGATGGAGACATCGCCCTTGGTATGTTTCAGCCTGAAATTCGCTATTAT  
TTGAATTAA

55

SEQ ID NO: 2 de la secuencia de polipéptidos de BASB203

MKGKITLFFFTALCFGLTGCIAPPKGLEKERFSINSYREISPQDLTCHCKTVRLGGKIINT  
60 TVLANQTKIEVLSLPVSSISAKPFVELQSDGRFIVYFNGFVEPENLKERYITVGGQLAGT  
EKGKIEQADYTPVVQADKYRIWTLSTTYDYPTDDWEDDWWGFFRWRHRPWYVQPEIRY  
LN

65

## ES 2 333 410 T3

SEQ ID NO: 3 de la secuencia de polinucleótidos de BASB203

5 ATGAAAGGAAAAATCACCTTATTTTTTACCGCACTTTGTTTTGGATTAACGGGCTGTATT  
GCACCACCAAAGGGTTAGAAAAAGAGCGATTCTCAATTAATTCCTATCGCGAGATTTCT  
CCTCAGGATTTGACCTGTCATTGTA AACAGTTCGACTGGAGGAAAAATTGTCAATACT  
ACCGTTTTAGCAAATCAAACAAAAATTGAAGTGTTAAGTTTACCCGTATCATCAATTTCA  
GGTAAACCATTTGTTGAATTGCAATCCGATGGTCGCTTTATCGTGTATTTCAACGGTTTT  
10 GTTGAACCTGAAAATTTAAAAGAGCGTTATATTACTGTAGGTGGTCAATTAGCAGGAACA  
GAGAAAGGCAAAATAGAACAAGCTGATTATACTTATCCTGTTGTTCAAGCGGATAAATAC  
CGTATTTGGACACTCAGTACCATCTATGAGTATCCAACAGATGATTGGGATGAAGACGAT  
GATTGGGGATTTTTTAGATGGAGACATCGCCCTTGGTATGTTTCAGCCTGAAATTCGGTAT  
15 TATTT

SEQ ID NO: 4 de la secuencia de polipéptidos de BASB203

20 MKGKITLFFFTALCFGLTGCIAPPKGLEKERFSINSYREISPODLTCHCKTVRLGGKIVNT  
TVLANQTKIEVLSLPVSSISGKPFVELQSDGRFIVYFNFGFVEPENLKERYITVGGQLAGT  
EKGKIEQADYTPVVQADKYRIWTLSTIYEYPTDDWDEDDDWGFFRWRHRPWYVQPEIRY  
Y

SEQ ID NO: 5 de la secuencia de polinucleótidos de BASB203

30 ATGAAAGGAAAAATCACCTTATTTTTTACCGCACTTTGTTTCGGATTAACGGGCTGTATT  
GCACCACCAAAGGGTTAGAAAAAGAGCGATTCTCAATTAATTCCTATCGCGAGATTTCT  
CCTCAGGATTTGACCTGTCATTGTA AACAGTTCGACTGGAGGAAAAATTGTCAATACT  
ACCGTTTTAGCAAATCAAACAAAAATTGAAGTGTTAAGTTTACCCGTATCATCAATTTCA  
35 GGTAACCATTTGTTGAATTGCAATCCGATGGTCGCTTTATCGTGTATTTCAACGGTTTT  
GTTGAGCCTGAAAATTTAAAAGAACGTTATATTACTGTAGGTGGGCAATTAGCAGGAACA  
GAGAAAGGCAAAATAGAACAAGCTGATTATACTTATCCTGTTGTTCAAGCGGATAAATAC  
CGTATTTGGACACTCAGTACCATCTATGAGTATCCAACAGATGATTGGGATGAAGATGAT  
40 GATTGGGGATTTTTTAGATGGAGACATCGCCCTTGGTATGTTTCAGCCTGAAATTCATAT  
TATTTGAATTAA

SEQ ID NO: 6 de la secuencia de polipéptidos de BASB203

45 MKGKITLFFFTALCFGLTGCIAPPKGLEKERFSINSYREISPODLTCHCKTVRLGGKIVNT  
TVLANQTKIEVLSLPVSSISGKPFVELQSDGRFIVYFNFGFVEPENLKERYITVGGQLAGT  
EKGKIEQADYTPVVQADKYRIWTLSTIYEYPTDDWDEDDDWGFFRWRHRPWYVQPEIHY  
50 YLN

SEQ ID NO: 7 de la secuencia de polinucleótidos de BASB203

55 ATGAAAGGAAAAATCACCTTATTTTTTACCGCACTTTGTTTCGGATTAACGGGCTGTATT  
GCACCACCAAAGGGTTAGAAAAAGAGCGATTCTCAATTAATTCCTATCGCGAGATTTCT  
CCTCAGGATTTGACCTGTCATTGTA AACAGTTCGACTGGAGGAAAAATTATCAATACT  
ACCGTTTTAGCAAATCAAACAAAAATTGAAGTGTTAAGTTTACCCGTATCATCAATTTCA  
60 GCTAAACCATTTGTTGAATTGCAATCCGATGGTCGCTTTATCGTGTATTTCAACGGTTTT  
GTTGAGCCTGAAAATTTAAAAGAACGTTATATTACTGTAGGTGGTCAATTAGCTGGAACA  
GAGAAAGGCAAAATAGAACAAGCTGATTATACTTATCCTGTTGTTCAAGCGGATAAATAC  
CGTATTTGGACACTCAGTACCACCTATGATTATCCAACAGATGATTGGGATGAAGATGAT  
TGGGGATTTTTTAGATGGAGACATCGCCCTTGGTATGTTTCAGCCTGAAATTCGCTATTAT  
65 TTGAATTAA

## ES 2 333 410 T3

SEQ ID NO: 8 de la secuencia de polipéptidos de BASB203

5 MKGKITLFFFTALCFGLTGCIAPPKGLEKERFSINSYREISPQDLTCHCKTVRLGGKIINT  
TVLANQTKIEVLSLPVSSISAKPFVELQSDGRFIVYFNGFVEPENLKERYITVGGQLAGT  
EKGKIEQADYTPVVQADKYRIWTLSTTYDYPTDDWDEDD-WGFFRWRHRPWPYVQPEIRY  
YLN

10 SEQ ID NO: 9 de la secuencia de polinucleótidos de BASB203

15 ATGAAAGGTAAAAATCCCTTATTTTTTACCGCACTTTGTTTCGGATTAACGGGCTGTATT  
GCACCACCAAAAAGGGTTAGAAAAAGAGCGATTCTCAATTAATTCCTATCGCGAGATTTCT  
CCTCAGGATTTGACCTGTCATTGTAAAACAGTTCGACTTGGAGGAAAAATTATCAATACT  
ACCGTTTTAGCAAATCAAACAAAATTTGAAGTGTAAAGTTTACCCGTATCATCAATTTCA  
GGTAAACCATTGTGTAATGCAATCCGATGGTCGCTTTATCGTGTATTTCAACGGTTTTT  
20 GTTGAGCCTGAAAATTTAAAAGAACGTTATATTACTGTAGGTGGTCAATTAGCTGGAACA  
GAGAAAGGCAAAATAGAACAAGCTGATTATACTTATCCTGTTGTTCAAGCGGATAAATAC  
CGTATTTGGACACTCAGTACCACCTATGATTATCCAACAGATGATTGGGATGAAGACGAT  
GATTGGGGATTTTTTAGATGGAGATATCGCCCTTGGTATGTTGAGCCTGAAATTCGCTAT  
TATTTGAATTAA

25

SEQ ID NO: 10 de la secuencia de polipéptidos de BASB203

30 MKGKNPLFFFTALCFGLTGCIAPPKGLEKERFSINSYREISPQDLTCHCKTVRLGGKIINT  
TVLANQTKIEVLSLPVSSISGKPFVELQSDGRFIVYFNGFVEPENLKERYITVGGQLAGT  
EKGKIEQADYTPVVQADKYRIWTLSTTYDYPTDDWDEDDDWGFFRWRYPWPYVQPEIRY  
YLN

35 SEQ ID NO: 11 de la secuencia de polinucleótidos aguas arriba del codón de iniciación previsto del polinucleótido  
BASB203

40 TGAAAGCTCGCATTGAGGATTGTCGTTTACAAGGTGGCGATCCATTCAATGATATTTCAA  
TTCCTGAAGCGGTGATTACCTTGAAACAAGGCGTTGGACGTTTAAATTCGTGATGTTACAG  
ATCGTGGCGTTGTGATTATTTGTGATAATCGATTAGTGATGCGCAATTATGGCGAAACTT

45 TTTTGAAGTTTACCGAACTCAAGTCGTACCCGTGATCTCAACAAAAGTGATACAATTCT  
TACAAAATAAGTAAACGAGAATAATAATGCAAAATTTAACTTTATTGGCGTTGGACACCT  
CTACTGAAGCCTGTTTCAGTCGCTTTATTGTATCGTGGTGAGAAAAACATATTAATGAAC  
TAGCACAAACGCACACACACTAAACGAATTTTACCTATGATCGATGAAATTTTGGCAAAT  
50 CGGGTTTAGGTTTAAATCAAGTTGATGCTTTAGCTTTTGGGCGTGGGCTGGTAGTTTTA  
CTGGCGTTCGTGTTGGTGCTGGGATTGCTCAAGGTTTAGCGTTTGGTGCGGATTTGCCTG  
TCATTCCAATTTCAAATTTAACCGCAATGGCACAGGCGCATTTGAATTACATCAAGCAG  
AAAATGTCGTTGCCGCAATTGATGCCAGAATGAATGAAGTCTATTTTTCTCAAGTAGTGA  
55 GAGAAAAAGTGCAGTTGAGATTTTGGGGAAGTTTTTCAATGGCGAGAAATCATTAGCGAAC  
AAGTTTGTCTCCAGAACAAGCGATTAATCAGCTTCAAAATGATAACGCATTTAGAGTAG  
GGAGAGTTGGGCTGCTTATTCTCAATTTACTGAAAAAATCTAACTGGCTCAGATATAG  
AACTACCTAATGCCTTATATATGTTAGAACTTCACAGTAGAATTTTTGCAAAAACACA  
60 CAATTTAGCTTTAGAGATTGAACCGATTTATTTGCGAAACGAGTTACTTGGAAAAAAT  
TACCAGGACGTGAATAAGTTTAAATAACTGGAGGATAGAAA

SEQ ID NO: 12

65 TC ATG AAA GGA AAA ATC ACC

## ES 2 333 410 T3

SEQ ID NO: 13

AGA TCT ATT CAA ATA ATA GCG AAT

5

SEQ ID NO: 14

GTA AAA CGA CGG CCA GT

10

SEQ ID NO: 15

CAG GAA ACA GCT ATG AC

15

SEQ ID NO: 16

CGT GAA TAA GTT TAA ATA ACT GG

20

SEQ ID NO: 17

TCC TAA TTT GTT GGA AAA TCT TTA

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición de vacuna que comprende un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 90% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10, sobre la longitud completa de dicha secuencia, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1 en la que el polipéptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 95% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10, sobre la longitud completa de dicha secuencia.
- 15 3. La composición según la reivindicación 1 ó 2 en la que el polipéptido aislado comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10.
- 20 4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la que el polipéptido aislado consta de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10.
- 25 5. Una composición de vacuna que comprende un polipéptido aislado que comprende un fragmento inmunógeno de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10, en la que el fragmento inmunógeno (si fuera necesario, cuando está acoplado a un vehículo) es capaz de generar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 ó 10 respectivamente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 6. Una composición de vacuna que comprende un fragmento inmunógeno de un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10, en la que el fragmento inmunógeno (si fuera necesario, cuando está acoplado a un vehículo) es capaz de generar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 ó 10 respectivamente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 7. Una composición de vacuna que comprende una proteína de fusión que comprende el polipéptido o fragmento inmunógeno definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 8. Una composición de vacuna que comprende un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 9. Una composición de vacuna que comprende un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 90% con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10, sobre la longitud completa de dicha secuencia y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 10. La composición según la reivindicación 9 en la que la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10.
- 55 11. Una composición de vacuna que comprende un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 y 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 60 12. Una composición de vacuna que comprende un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10 que se puede obtener seleccionando una librería apropiada en condiciones de hibridación rigurosas con una sonda marcada que tiene la secuencia de ADN correspondiente de la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 ó 9 respectivamente o uno de sus fragmentos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 65 13. Una composición de vacuna que comprende una vesícula de la membrana externa de la bacteria que comprende el polipéptido, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se puede obtener a partir de una célula hospedadora que comprende un vector de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido aislado definido en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 y una región aguas arriba modificada de dicho polinucleótido cuya región aguas arriba modificada contiene un elemento regulador heterólogo fuerte, en el que el polipéptido, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión se expresan sobre la membrana externa, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Una composición de vacuna que comprende una vesícula de la membrana externa de la bacteria que comprende el polipéptido, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se puede obtener a partir de una célula hospedadora que comprende un polinucleótido que comprende el polinucleótido aislado definido en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 y una región aguas arriba modificada de dicho polinucleótido aislado cuya región aguas arriba modificada contiene un elemento regulador heterólogo fuerte, en el que el polipéptido, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión se expresan sobre la membrana externa, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

## ES 2 333 410 T3

15. Una composición de vacuna que comprende un vector de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido aislado definido en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 y una región aguas arriba modificada de dicho polinucleótido cuya región aguas arriba modificada contiene un elemento regulador heterólogo fuerte, una célula hospedadora que comprende dicho vector, o una fracción subcelular o una membrana de dicha célula hospedadora que expresa el polipéptido aislado, el fragmento inmunógeno, o la proteína de fusión según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

16. Una composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en la que dicha composición de vacuna comprende adicionalmente uno o más de los siguientes grupos de antígenos:

- a) uno o más polisacáridos capsulares de pneumococo;
- b) uno o más antígenos que pueden proteger a un hospedador frente a una infección por *M. catarrhalis*;
- 15 c) uno o más antígenos de proteínas que pueden proteger a un hospedador frente a una infección por *Streptococcus pneumoniae*;
- d) uno o más antígenos de proteínas adicionales de *Haemophilus influenzae* no tipificables;
- 20 e) uno o más antígenos que pueden proteger a un hospedador frente a RSV;
- f) uno o más antígenos que pueden proteger a un hospedador frente al virus de la gripe.

25 17. La composición de vacuna de la reivindicación 16, en la que el uno o más antígenos que pueden proteger a un hospedador frente a una infección por *M. catarrhalis* se seleccionan de una lista que consta de OMP106, OMP21, UspA1 y/o UspA2, OmpCD, D15 y Hly3.

30 18. La composición de vacuna de la reivindicación 16 ó 17, en la que el uno o más antígenos de proteínas que pueden proteger a un hospedador frente a una infección por *Streptococcus pneumoniae* se seleccionan de una lista que consta de: pneumolisina, PspC, PsaA y CbpA.

35 19. La composición de las reivindicaciones 16 a 18, en la que el uno o más antígenos de proteínas adicionales de *Haemophilus influenzae* no tipificable se seleccionan de una lista que consta de: OMP26, P6, proteína D, Hia, Hsf, Hmw1, Hmw2, How3, Hmw4, Hap, D15, P2 y P5.

40 20. Uso de una cantidad eficaz de un polipéptido aislado, un fragmento inmunógeno o una proteína de fusión según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la preparación de un medicamento para la generación de una respuesta inmunitaria en un animal que da lugar a la prevención o el tratamiento de una infección.

21. Uso de una cantidad eficaz de un polinucleótido aislado definido en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 en la preparación de un medicamento para la generación de una respuesta inmunitaria en un animal que da lugar a la prevención o el tratamiento de una infección.

45 22. Uso de un vector de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido aislado definido en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 y una región aguas arriba modificada de dicho polinucleótido cuya región aguas arriba modificada contiene un elemento regulador heterólogo fuerte, una célula hospedadora que comprende dicho vector, o una fracción subcelular o una membrana de dicha célula hospedadora que expresa un polipéptido aislado, un fragmento inmunógeno o una proteína de fusión según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la vesícula de la membrana externa de la bacteria definida en las reivindicaciones 13 ó 14, en la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmunitaria en un animal que da lugar a la prevención o el tratamiento de una infección.

55 23. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en la que la infección es una infección por *H. influenzae* no tipificable.

60 24. Una composición terapéutica útil en el tratamiento de seres humanos con una enfermedad por *H. influenzae* no tipificable que comprende al menos un anticuerpo dirigido contra un polipéptido aislado o un fragmento inmunógeno según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéutico adecuado, y en el que dicho anticuerpo es inmunoespecífico para un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 10.

65 25. Un procedimiento para la fabricación de una composición de vacuna que comprende las etapas de preparación de células hospedadoras que comprenden un polinucleótido recombinante que comprende el polinucleótido aislado definido en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 que expresa un polipéptido recombinante que es el polipéptido aislado, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión según se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una fracción subcelular o una membrana de dicha célula hospedadora que comprende el polipéptido recombinante, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión y la formulación de dicho polipéptido recombinante, fragmento inmunógeno o proteína de fusión con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

## ES 2 333 410 T3

26. Una composición que comprende una cantidad eficaz del polipéptido aislado, el fragmento inmunógeno o la proteína de fusión según se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la generación de una respuesta inmunitaria en un animal que da lugar a la prevención o el tratamiento de una infección.

5 27. Una composición que comprende una cantidad eficaz del polinucleótido aislado definido en cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para generar una respuesta inmunitaria en un animal que da lugar a la prevención o el tratamiento de una infección.

10 28. Una composición que comprende un vector de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido aislado definido en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 y una región aguas arriba modificada de dicho polinucleótido cuya región aguas arriba modificada contiene un elemento regulador heterólogo fuerte, una célula hospedadora que comprende dicho vector o una fracción subcelular o una membrana de dicha célula hospedadora que expresa un polipéptido aislado, un fragmento inmunógeno o una proteína de fusión según se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la vesícula de la membrana externa de la bacteria definida en la reivindicación 13 ó 14, para  
15 generar una respuesta inmunitaria en un animal que da lugar a la prevención o el tratamiento de una infección.

29. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28 en la que la infección es infección por *H. influenzae* no tipificable.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 333 410 T3

Figura 1: Alineamiento de las secuencias de polinucleótidos BASB203.

La identidad con la SEQ ID NO: 1 está indicada por un punto. El hueco está indicado por un guión.

```

                *           20           *
seqid1 : ATGAAAGGAAAAATCACCTTATTTTTTACC : 30
seqid3 : ..... : 30
seqid5 : ..... : 30
seqid7 : ..... : 30
seqid9 : .....T....ATC..... : 30
    
```

```

                40           *           60
seqid1 : GCACTTTGTTTTGGATTAACGGGCTGTATT : 60
seqid3 : ..... : 60
seqid5 : .....C..... : 60
seqid7 : .....C..... : 60
seqid9 : .....C..... : 60
    
```

```

                *           80           *
seqid1 : GCACCACCAAAGGGTTAGAAAAAGAGCGA : 90
seqid3 : ..... : 90
seqid5 : ..... : 90
seqid7 : ..... : 90
seqid9 : ..... : 90
    
```

```

                100           *           120
seqid1 : TTCTCAATTAATTCCTATCGCGAGATTTCT : 120
seqid3 : ..... : 120
seqid5 : ..... : 120
seqid7 : ..... : 120
seqid9 : ..... : 120
    
```

```

                *           140           *
seqid1 : CCTCAGGATTTGACCTGTCATTGTAAAACA : 150
    
```

ES 2 333 410 T3

Figura 2: Alineamiento de las secuencias de polipéptidos BASB203.

La identidad con la SEQ ID NO: 2 está indicada por un punto. El hueco está indicado por un guión.

```

                *           20           *
seqid2 : MKGKITLFFFTALCFGLTGCIAPPKGLEKER : 30
seqid4 : ..... : 30
seqid6 : ..... : 30
seqid8 : ..... : 30
seqid10: .....NP..... : 30
    
```

```

                40           *           60
seqid2 : FSINSYREISPODLTCHCKTVRLGGKIINT : 60
seqid4 : ..... : 60
seqid6 : ..... : 60
seqid8 : ..... : 60
seqid10: ..... : 60
    
```

```

                *           80           *
seqid2 : TVLANQTKIEVLSLPVSSISAKPFVELQSD : 90
seqid4 : .....G..... : 90
seqid6 : .....G..... : 90
seqid8 : ..... : 90
seqid10: .....G..... : 90
    
```

```

                100           *           120
seqid2 : GRFIVYFNGFVEPENLKERYITVGGQLAGT : 120
seqid4 : ..... : 120
seqid6 : ..... : 120
seqid8 : ..... : 120
seqid10: ..... : 120
    
```

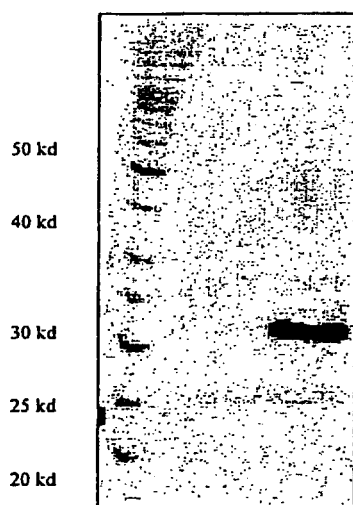
```

                *           140           *
seqid2 : EKGKIEQADYTYPPVQADKYRIWTLSTTYD : 150
    
```

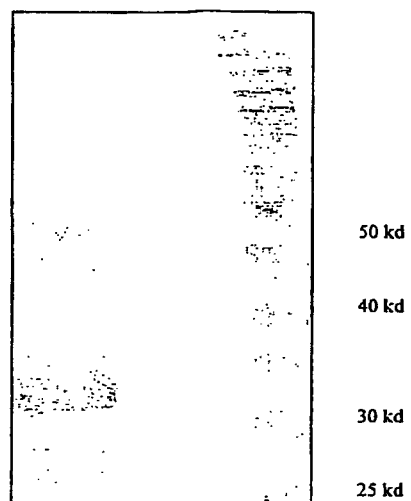
**Figura 3-A: Gel de SDS-poliacrilamida teñido con Coomassie de BASB203 purificado**

**Figura 3-B: Transferencia de Western de BASB203 purificado (anticuerpo anti-His)**

**Figura 3-A**



**Figura 3-B**



**Figura 4: Predicción de la estructura bidimensional, de los epítomos de linfocitos B y epítomos de linfocitos T ayudantes del polipéptido BASB203**

```

          *          20          *          40          *          60
seqid2 : MKGKITLFFLTALCFGLTGCIAPPKGLEKERFSINSYREISPODLTCHCKTVRLGCKIINT : 60
seqid4 : ..... : 60
seqid6 : ..... : 60
seqid8 : ..... : 60
seqid10 : ...NP..... : 60
2D Pred : CCCCEEEHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCHHCECCCCCEEECEEEEEE
Bepítopo : .....BBBBBB.....BBBBBBBBBB.....
Tepítopo : TTTTTTTTTTTTTTT.....TTTTTTTTT.....TTTTTTTTT.
    
```

```

          *          80          *          100          *          120
seqid2 : TVLANQTKIEVLSLPVSSISAKPFVELQSDGRFIVYFNGFVEPENLKERYITVGGQLAGT : 120
seqid4 : .....G..... : 120
seqid6 : .....G..... : 120
seqid8 : ..... : 120
seqid10 : .....G..... : 120
2D Pred : EECCCCEEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCCEEEEEECCCC
Bepítopo : .....BBBBBB.....
Tepítopo : .....TTTTTTTTT.....TTTTTTTTTTTTTTTT.....
    
```

```

          *          140          *          160          *          180
seqid2 : EKGKIEQADYTPVVQADKYRIWTLSTTYDYPTDDWDEDD-WGPFWRHRPWPYVQPEIRY : 179
seqid4 : .....I.E.....D..... : 180
seqid6 : .....I.E.....D.....H..... : 180
seqid8 : ..... : 179
seqid10 : .....D.....Y..... : 180
2D Pred : CCCCECCCCCEEEEEEEEEEEEEEEEEEECCCCCCCCC CCCCCCCCCCEEEEEEEEE
Bepítopo : ....BBBBB.....BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB.....
Tepítopo : .....TTTTTTTTTTTTTTTTT.....TTTTTTTTTTTTTTTTT
    
```

```

seqid2 : YLN : 182
seqid4 : --- : 181
seqid6 : ... : 183
seqid8 : ... : 182
seqid10 : ... : 183
2D Pred : EEC
Bepítopo : ...
Tepítopo : ...
    
```

**H: hélice  $\alpha$ , E: lámina  $\beta$ , C: cinta**  
**B: epítomos de linfocitos B potenciales**  
**T: epítomos de linfocitos T ayudantes potenciales.**