



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 111**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/31** (2006.01)  
**C07K 14/285** (2006.01)  
**C07K 16/12** (2006.01)  
**A61K 39/102** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01976280 .6**  
86 Fecha de presentación : **05.10.2001**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1326982**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

54 Título: **Polipéptidos BASB205 y polinucleótidos que los codifican.**

30 Prioridad: **13.10.2000 GB 0025171**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

73 Titular/es: **GlaxoSmithKline Biologicals S.A.**  
**rue de l'Institut**  
**1330 Rixensart, BE**

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

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 305 111 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 BASB205 y polinucleótidos que los codifican.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a polinucleótidos (designados en la presente memoria como “polinucleótido(s) BASB205”), a polipéptidos codificados por los mismos (designados en la presente memoria como “BASB205” o “polipéptido(s) BASB205”), a materiales recombinantes y a procedimientos para su producción. En otro aspecto, la invención se refiere a procedimientos para usar dichos polipéptidos y polinucleótidos, incluyendo vacunas contra infecciones bacterianas. En un aspecto adicional, la invención se refiere a ensayos de diagnóstico para detectar la infección de ciertos patógenos.

**Antecedentes de la invención**

15 *Haemophilus influenzae* es una bacteria gramnegativa no móvil. El hombre es su único hospedador natural.

Los aislamientos de *H. influenzae* se clasifican habitualmente según su cápsula polisacárida. Se han identificado seis diferentes tipos capsulares designados a a f. Los aislamientos que no consiguen aglutinarse con antisueros originados contra uno de estos seis serotipos se clasifican como no tipables, y no expresan una cápsula.

El tipo b de *H. influenzae* es claramente diferente de los otros tipos porque es la causa principal de meningitis bacteriana y enfermedades sistémicas. Las *H. influenzae* no tipables (NTHi) se aíslan sólo ocasionalmente de la sangre de pacientes con enfermedad sistémica.

25 La NTHi es una causa común 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 secuelas potenciales. Se registran más de 3,5 millones de casos cada año en los Estados Unidos, y se estima que un 80% de los niños han experimentado al menos un episodio de otitis antes de alcanzar los 3 años (1). Si se deja sin tratar, o se cronifica, puede conducir a una pérdida de audición que puede ser temporal (en el caso de acumulación de fluido en el oído medio) o permanente (si el nervio auditivo está dañado). En lactantes, dichas pérdidas de audición pueden ser responsables de un aprendizaje retardado del habla.

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

Los datos epidemiológicos indican que, para los patógenos encontrados en el oído medio, la colonización del tracto respiratorio superior es un prerequisite absoluto para el desarrollo de una otitis; sin embargo, se requieren también otros factores para conducir a la enfermedad (3-9). Estos son importantes para desencadenar la migración de las bacterias en el oído medio por las trompas de Eustaquio, seguido de la iniciación de un proceso inflamatorio. Estos otros factores son desconocidos hasta la fecha. Se ha postulado que una anomalía transitoria del sistema inmunitario después de una infección vírica, por ejemplo, podría causar la incapacidad de controlar la colonización del tracto respiratorio (5). Es una explicación alternativa que la exposición a factores ambientales permite una colonización más importante de algunos niños, que posteriormente se vuelven susceptibles al desarrollo de otitis media debido a la presencia sostenida de patógenos del oído medio (2).

50 Se ha mostrado que diversas proteínas de *H. influenzae* están implicadas en la patogénesis o han mostrado conferir protección tras la vacunación en modelos animales.

Se ha reseñado la adherencia de NTHi a células epiteliales nasofaríngeas humanas (10). Aparte de fimbrias y pilosidades (11-15), se han identificado muchas adhesinas en NTHi. Entre ellas, dos proteínas de alto peso molecular expuestas en superficie designadas HMW 1 y HMW2 han mostrado mediar la adhesión de NTHi a células epiteliales (16). Se ha identificado otra familia de proteínas de alto peso molecular en cepas NTHi que carecen de proteínas pertenecientes a la familia HMW 1/HlvIW2. La proteína Hia de 115 kDa de NTHi (17) es altamente similar a la adhesina Hsf expresada por cepas de tipo b de *H. influenzae* (18). Otra proteína, la proteína Hap, muestra similitud con las serinproteasas IgA1 y se ha mostrado que está implicada tanto en la adhesión como en la entrada en la célula (19).

Se han identificado cinco proteínas de membrana externa (OMP) principales y numeradas numéricamente.

65 Estudios originales que usan cepas de tipo b de *H. influenzae* mostraron que anticuerpos específicos de P1 y P2 protegían a ratas lactantes de la exposición a infección posterior (20-21). Se encontró que P2 era capaz de inducir anticuerpos bactericidas y opsónicos, que están dirigidos contra las regiones variables presentes en estructuras de

## ES 2 305 111 T3

bucle expuestas en superficie de esta OMP integral (22-23). La lipoproteína P4 podía inducir también anticuerpos bactericidas (24). Se describe la clonación y secuenciación del gen estructural P4 por Green *et al.* (*Infection and Immunity*, sept. 1991, páginas 3191-3198).

5 P6 es una lipoproteína asociada a peptidoglicano conservada que constituye 1-5% de la membrana externa (25). Más tarde, se reconoció una lipoproteína de aproximadamente el mismo p. mol., denominada PCP (proteína reactiva cruzada con P6) (26). Una mezcla de lipoproteínas conservadas P4, P6 y PCP no reveló protección, medida en un modelo de otitis media en chinchilla (27). Sólo P6 parece inducir protección en el modelo de chinchilla (28).

10 P5 tiene homología de secuencia con OmpA de *Escherichia coli* integral (29-30). P5 parece experimentar una deriva antigénica durante infecciones persistentes con NTHi (31). Sin embargo, las regiones conservadas de esta proteína inducían la protección en el modelo de otitis media en chinchilla.

15 En línea con las observaciones realizadas con gonococos y meningococos, NTHi expresa un receptor de transferrina humana dual compuesto por TbpA y TbpB cuando crece con limitación de hierro. Los anti-TbpB protegían a ratas lactantes. (32). Se han descrito también receptores de hemoglobina/haptoglobina para NTHi (33). Se ha identificado también un receptor de hemo: hemopexina (34). También está presente un receptor de lactoferrina en NTHi, pero todavía no está caracterizado (35).

20 Una OMP de A 80 kDa, el antígeno de superficie D 15, proporciona protección frente a NTHi en un modelo de exposición a infección en ratón. (36). Una lipoproteína de membrana externa de 42 kDa, LPD, se conserva entre *Haemophilus influenzae* e induce anticuerpos bactericidas (37). Se encontró que una OMP de 98 kDa minoritaria (38) era un antígeno protector, pudiendo muy bien ser esta OMP una de las OMP inducibles por limitación de hierro o adhesinas de alto peso molecular que se han caracterizado. *H. influenzae* produce actividad proteasa IgA1 (39). Las proteasas IgA1 de NTHi revelan un alto grado de variabilidad antigénica (40). Se ha mostrado que otra OMP de NTHi, OMP26, una proteína de 26 kDa, potencia la depuración pulmonar en un modelo de rata (41). Se ha mostrado también que la proteína HtrA de NTHi es un antígeno protector. Es más, esta proteína protegía a chinchilla frente a otitis media y protegía a ratas lactantes frente a bacteremia de *H. influenzae* de tipo b (42).

### 30 Referencias antecedentes

1. Klein, J. O. (1994) *Clin. Inf. Dis.* 19: 823
2. Murphy, T. F. (1996) *Microbiol. Rev.* 60: 267
- 35 3. Dickinson, D. P. *et al.* (1988) *J. Infect. Dis.* 158: 205
4. Faden, H. L. *et al.* (1991) *Ann. Otorhinol. Laryngol.* 100: 612
- 40 5. Faden, H. L. *et al.* (1994) *J. Infect. Dis.* 169: 1312
6. Leach, A. J. *et al.* (1994) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13: 983
7. Prellner, K. P. *et al.* (1984) *Acta Otolaryngol.* 98: 343
- 45 8. Stenfors, L-E y Raisanen, S. (1992) *J. Infect. Dis.* 165: 1148
9. Stenfors, L-E y Raisanen, S. (1994) *Acta Otolaryngol.* 113: 191
- 50 10. Read, R. C. *et al.* (1991) *J. Infect. Dis.* 163: 549
11. Brinton, C. C. *et al.* (1989) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8: S54
12. Kar, S. *et al.* (1990) *Infect. Immun.* 58: 903
- 55 13. Gildorf, J. R. *et al.* (1992) *Infect. Immun.* 60: 374
14. St. Geme, J. W. *et al.* (1991) *Infect. Immun.* 59: 3366
- 60 15. St. Geme, J. W. *et al.* (1993) *Infect. Immun.* 61: 2233
16. St. Geme, J. W. *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2875
17. Barenkamp, S. J. y J. W. St Geme (1996) *Mol. Microbiol.* (en prensa)
- 65 18. St. Geme, J. W. *et al.* (1996) *J. Bact.* 178: 6281
19. St. Geme, J. W. *et al.* (1994) *Mol. Microbiol.* 14: 217

20. Loeb, M. R. *et al.* (1987) *Infect. Immun.* 55: 2612
21. Musson, R. S. Jr. *et al.* (1983) *J. Clin. Invest.* 72: 677
- 5 22. Haase, E. M. *et al.* (1994) *Infect. Immun.* 62: 3712
23. Troelstra, A. *et al.* (1994) *Infect. Immun.* 62: 779
24. Green, B. A. *et al.* (1991) *Infect. Immun.* 59: 3191
- 10 25. Nelson, M. B. *et al.* (1991) *Infect. Immun.* 59: 2658
26. Deich, R. M. *et al.* (1990) *Infect. Immun.* 58: 3388
- 15 27. Green, B. A. *et al.* (1993) *Infect. Immun.* 61:1950
28. Demaria, T. F. *et al.* (1996) *Infect. Immun.* 64: 5187
29. Miyamoto, N., Bakaletz, L. O. (1996) *Microb. Pathog.* 21: 343
- 20 30. Munson, R. S. Jr. *et al.* (1993) *Infect. Immun.* 61:1017
31. Duim, B. *et al.* (1997) *Infect. Immun.* 65: 1351
- 25 32. Loosmore, S. M. *et al.* (1996) *Mol. Microbiol.* 19: 575
33. Maciver, I. *et al.* (1996) *Infect. Immun.* 64: 3703
34. Cope, L. D. *et al.* (1994) *Mol. Microbiol.* 13: 868
- 30 35. Schryvers, A. B. *et al.* (1989) *J. Med. Microbiol.* 29: 121
36. Flack, F. S. *et al.* (1995) *Gene* 156: 97
- 35 37. Akkoyunlu, M. *et al.* (1996) *Infect. Immun.* 64: 4586
38. Kimura, A. *et al.* (1985) *Infect. Immun.* 47: 253
39. Mulks, M. H. y Shoberg, R. J. (1994) *Meth. Enzymol.* 235: 543
- 40 40. Lomholt, H. Alphen, Lv, Kilian, M. (1993) *Infect. Immun.* 61: 4575
41. Kyd, J. M. y Cripps, A. W. (1998) *Infect. Immun.* 66: 2272
- 45 42. Loosmore, S. M. *et al.* (1998) *Infect. Immun.* 66: 899

La frecuencia de las infecciones por NTHi ha crecido drásticamente en las últimas décadas. Este fenómeno ha creado una necesidad médica insatisfecha de nuevos agentes antimicrobianos, vacunas, procedimientos de cribado de medicamentos y ensayos de diagnóstico para este organismo. La presente invención se dirige a satisfacer esa necesidad.

## 50 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a BASB205, en particular a polipéptidos BASB205 y a polinucleótidos BASB205, a materiales recombinantes y a procedimientos para su producción. En otro aspecto, la invención se refiere a procedimientos para usar dichos polipéptidos y polinucleótidos, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades microbianas, entre otras. En un aspecto adicional, la invención se refiere a ensayos de diagnóstico para detectar enfermedades asociadas a infecciones microbianas y afecciones asociadas a dichas infecciones, tales como ensayos para detectar la expresión o actividad de polinucleótidos o polipéptidos BASB205.

## 60 Descripción de la invención

La invención se refiere a polipéptidos y polinucleótidos BASB205 como se describen con mayor detalle a continuación. En particular, la invención se refiere a polipéptidos y polinucleótidos BASB205 de *H. influenzae* no tipable que están relacionados por homología de secuencia aminoacídica con el precursor Spr de lipoproteína de *E. coli*. El polipéptido BASB205 tiene una secuencia señal característica de una lipoproteína. La secuencia señal se escinde en la proteína madura. Es probable que la proteína madura esté expuesta en la superficie de las bacterias. El polipéptido BASB205 contiene un dominio similar a NLpC-P60. Este dominio está localizado desde el residuo 22 hasta el final, y se encuentra en algunas lipoproteínas.

## ES 2 305 111 T3

La invención se refiere especialmente a polinucleótidos BASB205 y a polipéptidos codificados enumerados en la Tabla A. Esos polinucleótidos y polipéptidos codificados tienen las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas exhibidas en la SEC N° ID 1 a la SEC N° ID 12 como se describen en la Tabla A.

5

TABLA A

10

Cepa	aislada en	de	Secuencia nucleotídica	Secuencia peptídica
3224A	EE.UU.	Otitis media	SEC N° ID 1	SEC N° ID 2
3219C	EE.UU.	Otitis media	SEC N° ID 3	SEC N° ID 4
901905U	Holanda	Fibrosis quística	SEC N° ID 5	SEC N° ID 6
772	Suecia	Exudado nasofaríngeo	SEC N° ID 7	SEC N° ID 8
289		Bronquitis crónica	SEC N° ID 9	SEC N° ID 10
A840177	Holanda	Cepa portadora	SEC N° ID 11	SEC N° ID 12

15

20

25 Se entiende que las secuencias citadas en el listado de secuencias siguiente como “ADN” representan una ejemplificación de un aspecto de la invención, puesto que los expertos reconocerán que dichas secuencias pueden emplearse útilmente en polinucleótidos en general, incluyendo ribopolinucleótidos.

30

Las secuencias de los polinucleótidos BASB205 se exhiben en las SEC N° ID: 1, 3, 5, 7, 9, 11. El grupo 1 de SEC designa en la presente memoria uno cualquiera de los polinucleótidos exhibidos en las SEC N° ID: 1, 3, 5, 7, 9, 11.

35

Las secuencias de los polipéptidos codificados BASB205 se exhiben en las SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, 10, 12. El grupo 2 de SEC designa en la presente memoria uno cualquiera de los polipéptidos exhibidos en las SEC N° ID: 2, 4, 6, 8, 10, 12.

### *Polipéptidos*

40

En un aspecto de la invención, se dan a conocer polipéptidos de *H. influenzae* no tipable designados en la presente memoria como “BASB205” y “polipéptidos BASB205”, así como variantes útiles biológica, diagnóstica, profiláctica, clínica o terapéuticamente de los mismos, y composiciones que comprenden los mismos.

La presente invención se refiere adicionalmente a:

45

(a) un polipéptido aislado que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos un 85% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, más preferiblemente al menos un 95% de identidad, lo más preferiblemente al menos un 97-99% o identidad exacta con la de cualquier secuencia del grupo 2 de SEC;

50

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 85% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, más preferiblemente al menos un 95% de identidad, aún más preferiblemente al menos un 97-99% o identidad exacta con la de cualquier secuencia del grupo 1 de SEC por toda la longitud de la secuencia seleccionada del grupo 1 de SEC; o

55

(c) un polipéptido codificado por un polinucleótido aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene al menos un 85% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, más preferiblemente al menos un 95% de identidad, aún más preferiblemente al menos un 97-99% o identidad exacta con la de la secuencia aminoacídica de cualquier secuencia del grupo 2 de SEC.

60

Los polipéptidos BASB205 dados a conocer en el grupo 2 de SEC son polipéptidos BASB20S de cepas de *H. influenzae* no tipables como se describen en la Tabla A.

65

La invención se refiere también a un fragmento inmunogénico de un polipéptido BASB205, es decir, una porción contigua del polipéptido BASB205 que tiene la misma o sustancialmente la misma actividad inmunogénica que el polipéptido que comprende la correspondiente secuencia aminoacídica seleccionada del grupo 2 de SEC; es decir, el fragmento (en caso necesario acoplado a un portador) es capaz de originar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido BASB205. Dicho fragmento inmunogénico puede incluir, por ejemplo, el polipéptido BASB205 que carece de una secuencia líder N-terminal, y/o un dominio transmembrana y/o un dominio de anclaje C-terminal. En un aspecto preferido, el fragmento inmunogénico de BASB205 según la invención comprende sustancialmente todo el dominio extracelular de un polipéptido que tiene al menos un 85% de identidad, preferiblemente al menos un 90%

## ES 2 305 111 T3

de identidad, más preferiblemente al menos un 95% de identidad, lo más preferiblemente 97-99% de identidad con la de una secuencia seleccionada del grupo 2 de SEC por toda la longitud de dicha secuencia.

5 Un fragmento es un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica que es enteramente la misma que parte, pero no toda, de cualquier secuencia aminoacídica de cualquier polipéptido de la invención. Como con los polipéptidos BASB205, los fragmentos pueden ser “independientes” o estar comprendidos en un polipéptido mayor del que forman una parte o región, lo más preferiblemente en forma de una sola región continua en un solo polipéptido mayor.

10 Los fragmentos preferidos incluyen, por ejemplo, polipéptidos truncados que tienen una porción de una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo 2 de SEC o de variantes del mismo, tales como una serie continua de residuos que incluye una secuencia aminoacídica amino- y/o carboxilo-terminal. Se prefieren también las formas de degradación de los polipéptidos de la invención producidas por o en un hospedador. Se prefieren adicionalmente fragmentos caracterizados por atributos estructurales o funcionales tales como fragmentos que comprenden regiones de hélice alfa y formadoras de hélice alfa, regiones de lámina beta y formadoras de lámina beta, regiones de giro y formadoras de giro, regiones de espiral y formadoras de espiral, regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones anfipáticas alfa, regiones anfipáticas beta, regiones flexibles, regiones formadoras de superficie, regiones de unión a sustrato y regiones de alto índice antigénico.

20 Los fragmentos preferidos adicionales incluyen un polipéptido aislado que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos 15, 20, 30, 40, 50 ó 100 aminoácidos contiguos de una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo 2 de SEC o un polipéptido aislado que comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos 15, 20, 30, 40, 50 ó 100 aminoácidos contiguos truncados o eliminados de una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo 2 de SEC.

25 El polipéptido BASB205 tiene un dominio similar a NLpC-P60. Este dominio está localizado desde el residuo 22 hasta el final. Los fragmentos preferidos incluyen este dominio de cualquiera de los polipéptidos del grupo 2 de SEC.

30 Son más fragmentos preferidos adicionales aquellos que comprenden un epítipo de linfocitos B o T auxiliares, por ejemplo, aquellos fragmentos/péptidos descritos en el Ejemplo 13.

Los fragmentos de los polipéptidos de la invención pueden emplearse para producir el correspondiente polipéptido completo mediante síntesis peptídica; por lo tanto, estos fragmentos pueden emplearse como intermedios para producir los polipéptidos completos de la invención.

35 Se prefieren particularmente variantes en las que se sustituyen, eliminan o añaden varios, 5-10, 1-5, 1-3, 1-2 ó 1 aminoácido en cualquier combinación.

40 Los polipéptidos o fragmentos inmunogénicos de la invención pueden estar en forma de la proteína “madura” o pueden ser parte de una proteína mayor tal como un precursor o una proteína de fusión. A menudo, es ventajoso incluir una secuencia aminoacídica adicional que contenga secuencias secretoras o líder, prosecuencias, secuencias que ayuden a la purificación tales como residuos múltiples de histidina, o una secuencia adicional para estabilidad durante la producción recombinante. Además, se considera también la adición de polipéptido exógeno o cola lipídica o secuencias polinucleotídicas para aumentar el potencial inmunogénico de la molécula final.

45 En un aspecto, la invención se refiere a proteínas de fusión solubles modificadas por ingeniería genética que comprenden un polipéptido de la presente invención, o un fragmento del mismo, y diversas porciones de las regiones constantes de cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulinas de diversas subclases (IgG, IgM, IgA, IgE). Se prefiere como inmunoglobulina la parte constante de la cadena pesada de IgG humana, particularmente IgG1, en la que la fusión tiene lugar en la región de bisagra. En una realización particular, la parte Fc puede retirarse simplemente mediante la incorporación de una secuencia de escisión que puede escindirse con el factor de coagulación sanguínea Xa.

55 Además, esta invención se refiere a procesos para la preparación de estas proteínas de fusión mediante ingeniería genética y al uso de los mismos para cribado de medicamentos, diagnóstico y terapia. Un aspecto adicional de la invención se refiere también a polinucleótidos que codifican dichas proteínas de fusión. Pueden encontrarse ejemplos de tecnología de proteína de fusión en las solicitudes de patente internacional n° WO94/29458 y WO94/22914.

60 Las proteínas pueden estar químicamente conjugadas, o expresarse en forma de proteínas de fusión recombinantes que permiten producir niveles aumentados en un sistema de expresión en comparación con proteína no fusionada. La pareja de fusión puede ayudar a proporcionar epítopos T auxiliares (pareja de fusión inmunológica), preferiblemente epítopos T auxiliares reconocidos por seres humanos, o ayudar a expresar la proteína (potenciador de la expresión) a rendimientos mayores que la proteína recombinante nativa. Preferiblemente, la pareja de fusión será tanto una pareja de fusión inmunológica como una pareja potenciadora de la expresión.

65 Las parejas de fusión incluyen proteína D de *Haemophilus influenzae* y la proteína no estructural del virus de la gripe NS 1 (hemaglutinina). Es otra pareja de fusión la proteína conocida como Omp26 (documento WO 97/01638). Es otra pareja de fusión la proteína conocida como LytA. Preferiblemente, se usa la porción C-terminal de la molécula. LytA deriva de *Streptococcus pneumoniae* que sintetiza una *N*-acetil-L-alanina amidasa, la amidasa LytA, (codificada

## ES 2 305 111 T3

por el gen *lytA* (*Gene*, 43 (1986) páginas 265-272)) una autolisina que degrada específicamente ciertos enlaces en el esqueleto peptidoglicano. El dominio C-terminal de la proteína LytA es responsable de la afinidad por la colina o algunos análogos de colina tales como DEAE. Esta propiedad se ha explotado para el desarrollo de plásmidos que expresan C-LytA de *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 extremo amino {*Biotechnology*: 10, (1992) páginas 795-798}. Es posible usar la porción repetida de la molécula LytA encontrada en el extremo C-terminal partiendo del residuo 178, por ejemplo, los residuos 188-305.

La presente invención se refiere también a variantes de los polipéptidos anteriormente mencionados, es decir, polipéptidos que pueden variar de los referentes por sustituciones aminoacídicas conservativas, mediante las cuales se sustituye un residuo por otro con características similares. Son típicas de dichas sustituciones 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 de la presente invención pueden prepararse de cualquier manera adecuada. Dichos polipéptidos incluyen polipéptidos de origen natural, polipéptidos producidos recombinantemente, polipéptidos producidos sintéticamente o polipéptidos producidos mediante una combinación de estos procedimientos. Los medios para preparar dichos polipéptidos son bien conocidos en la técnica.

Lo más preferido es que un polipéptido de la invención derive de *H. influenzae* no tipable, sin embargo, puede obtenerse preferiblemente a partir de otros organismos del mismo género taxonómico. Un polipéptido de la invención puede obtenerse también, por ejemplo, a partir de organismos de la misma familia u orden taxonómico.

### *Polinucleótidos*

La invención da a conocer polinucleótidos que codifican polipéptidos BASB205, particularmente polinucleótidos que codifican los polipéptidos designados en la presente memoria como BASB205.

Los polinucleótidos comprenden preferiblemente una región que codifica polipéptidos BASB205 que comprende secuencias exhibidas en el grupo 1 de SEC que incluyen el gen completo o una variante del mismo.

Los polinucleótidos BASB205 dados a conocer en el grupo 1 de SEC son los polinucleótidos BASB205 de cepas de *H. influenzae* no tipables como se describen en la Tabla A.

Como aspecto adicional de la invención, se dan a conocer moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican y/o expresan polipéptidos y polinucleótidos BASB205, particularmente polipéptidos y polinucleótidos BASB205 de *H. influenzae* no tipable incluyendo, por ejemplo, ARN no procesados, ARN de ribozima, ARNm, ADNc, ADN genómicos, ADN B y Z. Aspectos adicionales de la invención incluyen polinucleótidos y polipéptidos biológica, diagnóstica, profiláctica, clínica o terapéuticamente útiles, y variantes de los mismos, y composiciones que comprenden los mismos.

Otro aspecto de la invención se refiere a polinucleótidos aislados, incluyendo al menos un gen completo que codifica un polipéptido BASB205 que tiene una secuencia aminoacídica deducida del grupo 2 de SEC, y polinucleótidos estrechamente relacionados con los mismos y variantes de los mismos.

Otro aspecto particularmente preferido de la invención se refiere a un polipéptido BASB205 de *H. influenzae* no tipable que comprende o consiste en una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo 2 de SEC o una variante del mismo.

Usando la información dada a conocer en la presente memoria, tal como secuencias polinucleotídicas exhibidas en el grupo 1 de SEC, puede obtenerse un polinucleótido de la invención que codifica polipéptidos BASB205 usando procedimientos de clonación y cribado estándar tales como aquellos de clonación y secuenciación de fragmentos de ADN cromosómico de bacterias usando células de cepa 3224A de *H. influenzae* no tipable como material de partida, seguido de la obtención de un clon completo. Por ejemplo, para obtener una secuencia polinucleotídica de la invención, tal como una secuencia polinucleotídica dada en el grupo 1 de SEC, se sondea típicamente una biblioteca de clones de ADN cromosómico de la cepa 3224A de *H. influenzae* no tipable en *E. coli* o algún otro hospedador adecuado con un oligonucleótido radiomarcado, preferiblemente de 17 unidades o más, derivado de una secuencia parcial. Los clones que portan ADN idéntico al de la sonda pueden distinguirse entonces usando condiciones estrictas de hibridación. Al secuenciar los clones individuales así identificados mediante hibridación con cebadores de secuenciación diseñados a partir de la secuencia polipeptídica o polinucleotídica original, es entonces posible extender la secuencia polinucleotídica en ambas direcciones para determinar una secuencia génica completa. Convenientemente, dicha secuenciación se realiza, por ejemplo, usando ADN bicatenario desnaturalizado preparado a partir de un clon plasmídico. Se describen las técnicas adecuadas por Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook *et al.*, "MOLECULAR CLONING, A 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). La secuenciación de ADN genómico directa puede realizarse también para obtener una secuencia génica completa. Es ilustrativo de la invención que cada polinucleótido exhibido en el grupo 1 de SEC fuera descubierto en una biblioteca de ADN derivada de *H. influenzae* no tipable.

## ES 2 305 111 T3

Además, cada secuencia de ADN exhibida en el grupo 1 de SEC contiene un marco abierto de lectura que codifica una proteína que tiene aproximadamente el número de residuos aminoacídicos expuestos en el grupo 2 de SEC, con un peso molecular deducido que puede calcularse usando valores de peso molecular de residuo aminoacídico bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los polinucleótidos del grupo 1 de SEC, entre el codón de inicio y el codón de terminación, codifican respectivamente los polipéptidos del grupo 2 de SEC. El número de nucleótido del codón de partida y del primer nucleótido del codón de terminación se enumeran en la Tabla B para cada polinucleótido del grupo 1 de SEC.

TABLA B

Secuencia nucleotídica	Secuencia peptídica codificada	Codón de inicio	Primer nucleótido del codón de terminación
SEC N° ID 1	SEC N° ID 2	1	550
SEC N° ID 3	SEC N° ID 4	1	550
SEC N° ID 5	SEC N° ID 6	1	550
SEC N° ID 7	SEC N° ID 8	1	550
SEC N° ID 9	SEC N° ID 10	1	550
SEC N° ID 11	SEC N° ID 12	1	550

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende o consiste en:

(a) una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 85% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, más preferiblemente al menos un 95% de identidad, aún más preferiblemente al menos un 97-99% o identidad exacta con la de cualquier secuencia polinucleotídica del grupo 1 de SEC por toda la longitud de la secuencia polinucleotídica del grupo 1 de SEC; o

(b) una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido que tiene al menos un 85% de identidad, preferiblemente al menos un 90% de identidad, más preferiblemente al menos un 95% de identidad, aún más preferiblemente al menos un 97-99% o 100% de identidad exacta con la de cualquier secuencia aminoacídica seleccionada del grupo 2 de SEC por toda la longitud de la secuencia aminoacídica del grupo 2 de SEC.

Puede obtenerse un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, incluyendo homólogos y ortólogos de especies distintas de *H. influenzae* no tipable, mediante un proceso que comprende las etapas de cribar una biblioteca apropiada en condiciones estrictas de hibridación (por ejemplo, usando una temperatura en el intervalo de 45-65°C y una concentración de SDS de 0,1-%) con una sonda marcada o detectable constituida por o que comprende cualquier secuencia seleccionada del grupo 1 de SEC, o un fragmento de la misma; y aislar un gen completo y/o clones genómicos que contienen dicha secuencia polinucleotídica.

La invención se refiere a una secuencia polinucleotídica idéntica por toda su longitud a una secuencia de codificación (marco abierto de lectura) exhibida en el grupo 1 de SEC. Se da a conocer también por la invención una secuencia de codificación de un polipéptido maduro o un fragmento del mismo por sí misma así como una secuencia de codificación de un polipéptido maduro o un fragmento en marco de lectura con otra secuencia de codificación, tal como una secuencia que codifica una secuencia líder o secretora, una secuencia pre-, pro- o preproteica. El polinucleótido de la invención puede contener también al menos una secuencia no codificante que incluye, por ejemplo pero sin limitación, al menos una secuencia 5' y 3' no codificante, tal 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 ribosoma, secuencias Kozak, secuencias que estabilizan el ARNm, intrones y señales de poliadenilación. La secuencia polinucleotídica puede comprender también secuencia de codificación adicional que codifica aminoácidos adicionales. Por ejemplo, puede codificar una secuencia marcadora que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas realizaciones de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexahistidina como se proporciona en el vector pQE (Qiagen, Inc.) y se describe en Gentz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 821-824 (1989), o un marcaje peptídico HA (Wilson *et al.*, *Cell* 37: 767 (1984), pudiendo ser ambos útiles para purificar la secuencia polipeptídica fusionada con ellos. Los polinucleótidos de la invención incluyen también, pero sin limitación, polinucleótidos que comprenden un gen estructural y sus secuencias asociadas naturalmente que controlan la expresión génica.

La secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido BASB205 del grupo 2 de SEC puede ser idéntica al correspondiente polinucleótido que codifica la secuencia del grupo 1 de SEC. La posición del primer y último nucleótidos de las secuencias de codificación del grupo 1 de SEC se enumeran en la Tabla C. Como alternativa, puede ser cualquier

## ES 2 305 111 T3

secuencia que como resultado de la redundancia (degeneración) del código genético codifique también un polipéptido del grupo 2 de SEC.

TABLA C

5

10

15

20

Secuencia nucleotídica	Secuencia peptídica codificada	Codón de inicio	Último nucleótido de la secuencia de codificación
SEC N° ID 1	SEC N° ID 2	1	549
SEC N° ID 3	SEC N° ID 4	1	549
SEC N° ID 5	SEC N° ID 6	1	549
SEC N° ID 7	SEC N° ID 8	1	549
SEC N° ID 9	SEC N° ID 10	1	549
SEC N° ID 11	SEC N° ID 12	1	549

25

30

El término “polinucleótido que codifica un polipéptido” como se usa en la presente memoria comprende polinucleótidos que incluyen una secuencia que codifica un polipéptido de la invención, particularmente un polipéptido bacteriano y más particularmente un polipéptido BASB205 de *H. influenzae* no tipable que tiene una secuencia aminoacídica exhibida en cualquiera de las secuencias del grupo 2 de SEC. El término comprende también polinucleótidos que incluyen una sola región continua o regiones discontinuas que codifican el polipéptido (por ejemplo, polinucleótidos interrumpidos por un fago integrado, una secuencia de inserción integrada, una secuencia de vector integrada, una secuencia de transposón integrada o, debido a la edición de ARN o la reorganización de ADN genómico), junto con regiones adicionales que pueden contener también secuencias de codificación y/o no codificación.

35

La invención se refiere adicionalmente a variantes de los polinucleótidos descritos en la presente memoria que codifican variantes de un polipéptido que tiene una secuencia aminoacídica deducida de cualquiera de las secuencias del grupo 2 de SEC. Pueden usarse fragmentos de polinucleótidos de la invención, por ejemplo, para sintetizar polinucleótidos completos de la invención.

40

Son fragmentos preferidos aquellos polinucleótidos que codifican un epítipo de linfocitos B o linfocitos T auxiliares, por ejemplo, los fragmentos/péptidos descritos en el ejemplo 13, y genes recombinantes quiméricos que comprenden dichos fragmentos polinucleotídicos.

45

Son aspectos particularmente preferidos adicionales polinucleótidos que codifican variantes BASB205 que tienen la secuencia aminoacídica del polipéptido BASB205 de cualquier secuencia del grupo 2 de SEC, en los que varios, unos pocos, 5 a 10, 1 a 5, 1 a 3, 2, 1 o ningún residuo aminoacídico está sustituido, modificado, eliminado y/o añadido en cualquier combinación. Se prefieren especialmente entre estos las sustituciones, adiciones y deleciones silenciosas, que no alteran las propiedades y actividades del polipéptido BASB205.

50

55

Son aspectos preferidos adicionales de la invención polinucleótidos que son al menos un 85% idénticos por toda su longitud a un polinucleótido que codifica un polipéptido BASB205 que tiene una secuencia aminoacídica exhibida en cualquiera de las secuencias del grupo 2 de SEC, y polinucleótidos que son complementarios de dichos polinucleótidos. Como alternativa, los más altamente preferidos son polinucleótidos que comprenden una región que es al menos un 90% idéntica por toda su longitud a un polinucleótido que codifica un polipéptido BASB205 y polinucleótidos complementarios del mismo. A este respecto, se prefieren particularmente los polinucleótidos al menos un 95% idénticos por toda su longitud al mismo. Además, aquellos con al menos un 97% son altamente preferidos entre aquellos con al menos un 95%, y entre estos, aquellos con al menos un 98% y al menos un 99% son particularmente altamente preferidos, siendo al menos un 99% lo más preferido.

60

Son aspectos preferidos polinucleótidos que codifican polipéptidos que retienen sustancialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido maduro codificado por una secuencia de ADN seleccionada del grupo 1 de SEC.

65

Según ciertos aspectos preferidos de esta invención, se dan a conocer polinucleótidos que hibridan, particularmente en condiciones estrictas, con secuencias polinucleotídicas BASB205, tales como los polinucleótidos del grupo 1 de SEC.

La invención se refiere adicionalmente a polinucleótidos que hibridan con las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en la presente memoria. A este respecto, la invención se refiere especialmente a polinucleótidos que hibridan en condiciones estrictas con los polinucleótidos descritos en la presente memoria. Como se usan en la presente memo-

ria, los términos “condiciones estrictas” y “condiciones estrictas de hibridación” significan que la hibridación ocurre sólo si hay al menos un 95%, y preferiblemente al menos un 97% de identidad entre las secuencias. Es un ejemplo específico de condiciones estrictas de hibridación una incubación de una noche a 42°C en una solución que comprende: 50% de formamida, 5x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón cizallado desnaturalizado, seguido de lavado del soporte de hibridación con 0,1x SSC aproximadamente a 65°C. Las condiciones de hibridación y lavado son bien conocidas y se ejemplifican en Sambrook, *et al.*, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2ª edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), particularmente el capítulo 11 del mismo. La solución de hibridación puede usarse también con las secuencias polinucleotídicas proporcionadas por la invención.

La invención se refiere también a un polinucleótido que consiste en o comprende una secuencia polinucleotídica obtenida cribando en una biblioteca apropiada que contiene el gen completo una secuencia polinucleotídica expuesta en cualquiera de las secuencias del grupo 1 de SEC en condiciones estrictas de hibridación con una sonda que tiene la secuencia de dicha secuencia polinucleotídica expuesta en la correspondiente secuencia del grupo 1 de SEC o un fragmento de la misma; y aislando dicha secuencia polinucleotídica. Los fragmentos útiles para obtener dicho polinucleótido incluyen, por ejemplo, sondas y cebadores completamente descritos en otro lugar de la presente memoria.

Como se discute en otro lugar de la presente memoria respecto a los ensayos polinucleotídicos de la invención, los polinucleótidos de la invención pueden usarse, por ejemplo, como sonda de hibridación para ADN, ADNc y ADN genómico para aislar ADNc completos y clones genómicos que codifican BASB205 y para aislar ADNc y clones genómicos de otros genes que tienen una alta identidad, particularmente una alta identidad de secuencia, con el gen BASB205. Dichas sondas comprenderán generalmente al menos 15 residuos nucleotídicos o pares de bases. Preferiblemente, dichas sondas tendrán al menos 30 residuos nucleotídicos o pares de bases y pueden tener al menos 50 residuos nucleotídicos o pares de bases. Las sondas particularmente preferidas tendrán al menos 20 residuos nucleotídicos o pares de bases y tendrán menos de 30 residuos nucleotídicos o pares de bases.

Puede aislarse una región de codificación de un gen BASB205 cribando mediante el uso de una secuencia de ADN proporcionada en el grupo 1 de SEC para sintetizar una sonda oligonucleotídica. Se usa después un oligonucleótido marcado que tiene una secuencia complementaria con la de un gen de la invención para cribar una biblioteca de ADNc, ADN genómico o ARNm para determinar con cuáles miembros de la biblioteca hibrida la sonda.

Hay varios procedimientos disponibles y bien conocidos por los expertos en la técnica para obtener ADN completos o extender ADN cortos, por ejemplo, aquellos basados en el procedimiento de amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) (véase, por ejemplo, Frohman, *et al.*, *PNAS USA* 85: 8998-9002, 1988). Modificaciones recientes de la técnica, ejemplificadas por la tecnología Marathon™ (Clontech Laboratories Inc.), por ejemplo, han simplificado significativamente la búsqueda de ADNc más largos. En la tecnología Marathon™, se han preparado ADNc a partir de ARNm extraído de un tejido elegido y se ha ligado una secuencia “adaptadora” a cada extremo. Se lleva a cabo entonces la amplificación de ácido nucleico (PCR) para amplificar el extremo 5’ “faltante” del ADN usando una combinación de cebadores oligonucleotídicos específicos de gen y específicos de adaptador. Se repite entonces la reacción PCR usando cebadores “anidados”, es decir, cebadores diseñados para reasociarse con el producto amplificado (típicamente un cebador específico de adaptador que se reasocia más 3’ en la secuencia adaptadora y un cebador específico de gen que se reasocia más 5’ en la secuencia génica seleccionada). Los productos de esta reacción pueden analizarse entonces por secuenciación de ADN y construirse un ADN completo uniendo el producto directamente al ADN existente para dar una secuencia completa, o llevando a cabo una PCR completa separada usando la nueva información de secuencia para el diseño del cebador 5’.

Los polinucleótidos y polipéptidos de la invención pueden emplearse, por ejemplo, como reactivos de investigación y materiales para el descubrimiento de tratamiento y diagnósticos de enfermedades, particularmente enfermedades humanas, como se discute adicionalmente en la presente memoria respecto a ensayos polinucleotídicos.

Los polinucleótidos de la invención que son oligonucleótidos derivados de una secuencia del grupo 1 de SEC pueden usarse en los procesos en la presente memoria como se han descrito, pero preferiblemente para PCR, para determinar si los polinucleótidos identificados en la presente memoria se transcriben o no en todo o en parte en bacterias en tejido infectado. Se reconoce que dichas secuencias tendrán también utilidad en el diagnóstico de la etapa de infección y el tipo de infección que ha alcanzado el patógeno.

La invención se refiere también a polinucleótidos que codifican un polipéptido que es una proteína madura más aminoácidos amino- o carboxiterminales adicionales, o aminoácidos interiores al polipéptido maduro (cuando la forma madura tiene más de una cadena polipeptídica, por ejemplo). Dichas secuencias pueden desempeñar un papel en el procesamiento de una proteína desde la forma precursora a la madura, pueden permitir el transporte de proteína, pueden alargar o acortar la semivida de la proteína o pueden facilitar la manipulación de una proteína para ensayo o producción, entre otras cosas. Como es generalmente el caso *in vivo*, los aminoácidos adicionales pueden procesarse fuera de la proteína madura por enzimas celulares.

Para todos y cada uno de los polinucleótidos de la invención, se da a conocer un polinucleótido complementario del mismo. Se prefiere que estos polinucleótidos complementarios sean totalmente complementarios de cada polinucleótido con el que son complementarios.

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

5

Además de las representaciones estándar A, G, C, T/U para nucleótidos, el término “N” puede usarse también para describir ciertos polinucleótidos de la invención. “N” significa que puede aparecer cualquiera de los cuatro nucleótidos de ADN o ARN en dicha posición designada en la secuencia de ADN o ARN, excepto porque se prefiere que N no sea un ácido nucleico que cuando se toma en combinación con posiciones nucleotídicas adyacentes, al leer en el marco de lectura correcto, tenga el efecto de generar un codón de terminación prematuro en dicho marco de lectura.

10

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

15

Según un aspecto de la invención, se proporciona el uso de un polinucleótido de la invención con fines terapéuticos o profilácticos, en particular inmunización genética.

20

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

25

### 30 Vectores, células hospedadoras, sistemas de expresión

La invención se refiere también a vectores que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos de la invención, a células hospedadoras que están modificadas por ingeniería genética con vectores de la invención y a la producción de polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes. Pueden emplearse también sistemas de traducción exentos de células para producir dichas proteínas usando ARN derivados de constructos de ADN de la invención.

35

Los polipéptidos recombinantes de la presente invención pueden prepararse mediante procesos bien conocidos por los expertos en la técnica a partir de células hospedadoras modificadas por ingeniería genética que comprenden sistemas de expresión. En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente invención se refiere a sistemas de expresión que comprenden un polinucleótido o polinucleótidos de la presente invención, a células hospedadoras que se modifican por ingeniería genética con dichos sistemas de expresión y a la producción de polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes.

40

Para la producción recombinante de los polipéptidos de la invención, pueden modificarse por ingeniería genética células hospedadoras para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos o polinucleótidos de la invención. La introducción de un polinucleótido en la célula hospedadora puede efectuarse mediante procedimientos descritos en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis, *et al.*, “BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY”, (1986) y Sambrook, *et al.*, “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 por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, conjugación, transducción, carga por raspado, introducción balística e infección.

50

Los 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 fúngicas 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 células CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, 293, CV y melanoma de Bowes; y células de planta, tales como células de una gimnosperma o angiosperma.

55

Pueden usarse una gran variedad de sistemas de expresión para producir los polipéptidos de la invención. Dichos vectores incluyen, entre otros, vectores derivados de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, papovavirus tales como SV40, virus Vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de pseudorrabia, picornavirus, retrovirus y alfavirus y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como aquellos derivados de elementos genéticos plasmídicos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos. Los constructos de sistema de expresión pueden contener regiones de control que regulan así como generan la expresión. Generalmente, puede usarse para expresión a este respecto cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos y/o para expresar un polipéptido en un hospedador.

65

## ES 2 305 111 T3

Puede insertarse la secuencia de ADN apropiada en el sistema de expresión mediante cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas y rutinarias tales como, por ejemplo, aquellas expuestas en Sambrook *et al.*, "MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL", (*supra*).

- 5 En sistemas de expresión recombinante en eucariotas, para la secreción de una proteína traducida al lumen del retículo endoplasmático, al espacio periplásmico o al entorno extracelular, pueden incorporarse señales de secreción apropiadas al polipéptido expresado. Estas señales pueden ser endógenas del polipéptido o pueden ser señales heterólogas.
- 10 Los polipéptidos de la presente invención pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes mediante procedimientos bien conocidos, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxipatito y cromatografía en lectina. Lo más preferiblemente, se emplea cromatografía de afinidad de metal iónico (IMAC) para purificación. Pueden emplearse técnicas bien conocidas para plegar proteínas para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante la síntesis intracelular, aislamiento y/o purificación.
- 15

El sistema de expresión puede ser también un microorganismo vivo recombinante tal como un virus o bacteria. El gen de interés puede insertarse en el genoma de un virus o bacteria vivo recombinante. La inoculación e infección *in vivo* con este vector vivo conducirá a la expresión *in vivo* del antígeno y a la inducción de respuestas inmunitarias. Los virus y bacterias usados con este fin son, por ejemplo: poxvirus (por ejemplo, Vaccinia, de la viruela aviar, de la viruela de canario), alfavirus (virus Sindbis, virus del bosque Semliki, virus de encefalitis equina venezolana), adenovirus, virus adenoasociados, picornavirus (poliovirus, rinovirus), herpesvirus (virus de varicela zóster, etc), *Listeria*, *Salmonella*, *Shigella*, BCG, estreptococos. Estos virus y bacterias pueden ser virulentos o atenuarse de diversos modos para obtener vacunas vivas. Dichas vacunas vivas pueden formar también parte de la invención.

20

25

### *Ensayos de diagnóstico, pronóstico, serotipado y mutación*

Esta invención se refiere también al uso de polinucleótidos y polipéptidos BASB205 de la invención para uso como reactivos de diagnóstico. La detección de polinucleótidos y/o polipéptidos BASB205 en un eucariota, particularmente un mamífero, y especialmente un ser humano, proporcionará un procedimiento de diagnóstico de la enfermedad, etapa de la enfermedad o respuesta de un organismo infectado a medicamentos. Los eucariotas, particularmente mamíferos, y especialmente seres humanos, particularmente aquellos infectados o sospechosos de estar infectados con un organismo que comprende el gen o proteína BASB205, pueden detectarse al nivel de ácido nucleico o aminoácido mediante una variedad de técnicas bien conocidas así como mediante procedimientos proporcionados en la presente memoria.

30

35

Los polipéptidos y polinucleótidos para pronóstico, diagnóstico u otros análisis pueden obtenerse a partir de materiales corporales de un individuo supuestamente infectado y/o infectado. Los polinucleótidos de cualquiera de estas fuentes, particularmente ADN o ARN, pueden usarse directamente para la detección o pueden amplificarse enzimáticamente usando PCR o cualquier otra técnica de amplificación antes del análisis. Pueden usarse también ARN, particularmente ARNm, ADNc y ADN genómico del mismo modo. Usando la amplificación, puede realizarse la caracterización de la especie y cepa del organismo infeccioso o residente presente en un individuo mediante el análisis del genotipo de un polinucleótido seleccionado del organismo. Las deleciones e inserciones pueden detectarse mediante el cambio de tamaño del producto amplificado en comparación con un genotipo de una secuencia de referencia seleccionada de un organismo relacionado, preferiblemente una especie diferente del mismo género o una cepa diferente de la misma especie. Las mutaciones puntuales pueden identificarse hibridando ADN amplificado con secuencias polinucleotídicas BASB205 marcadas. Las secuencias perfecta o significativamente coincidentes pueden distinguirse de los dúplex imperfectos o más significativamente mal emparejados mediante digestión con ADNasa o ARNasa, para ADN o ARN respectivamente, o detectando diferencias en las temperaturas de fusión o la cinética de renaturalización. Las diferencias en la secuencia polinucleotídica pueden detectarse también mediante alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos polinucleotídicos en geles en comparación con una secuencia de referencia. Esto puede llevarse a cabo con o sin agentes desnaturizantes. Las diferencias polinucleotídicas pueden detectarse también mediante secuenciación directa de ADN o ARN. Véase, por ejemplo, Myers *et al.*, *Science*, 230: 1242 (1985). Los cambios de secuencia en localizaciones específicas pueden revelarse también mediante ensayos de protección de nucleasa tales como ARNasa, ensayo de protección V y S1 o un procedimiento de escisión química. Véase, por ejemplo, Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 4397-4401 (1985).

40

45

50

55

En otro aspecto, puede construirse una matriz de sondas oligonucleotídicas que comprenden una secuencia nucleotídica BASB205 o fragmentos de la misma para realizar un cribado eficaz de, por ejemplo, mutaciones genéticas, serotipo, clasificación taxonómica o identificación. Los procedimientos de tecnología de matriz son bien conocidos, tienen aplicabilidad general y pueden usarse para responder a una variedad de cuestiones en genética molecular, incluyendo expresión génica, ligamiento genético y variabilidad genética (véase, por ejemplo, Chee *et al.*, *Science*, 274: 610 (1996)).

60

65 Por tanto, en otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico que comprende:

(a) un polinucleótido de la presente invención, preferiblemente cualquiera de las secuencias nucleotídicas del grupo 1 de SEC, o un fragmento del mismo;

## ES 2 305 111 T3

(b) una secuencia nucleotídica complementaria de la de (a);

(c) un polipéptido de la presente invención, preferiblemente cualquiera de los polipéptidos del grupo 2 de SEC o un fragmento del mismo; o

(d) un anticuerpo de un polipéptido de la presente invención, preferiblemente de cualquiera de los polipéptidos del grupo 2 de SEC.

Se apreciará que, en cualquiera de dichos kit, (a), (b), (c) o (d) pueden comprender un componente sustancial. Dicho kit será de uso en el diagnóstico de una enfermedad o susceptibilidad a una enfermedad, entre otros.

Esta invención se refiere también al uso de polinucleótidos de la presente invención como reactivos de diagnóstico. La detección de una forma mutada de un polinucleótido de la invención, preferiblemente cualquier secuencia del grupo 1 de SEC que esté asociada a una enfermedad o patogenicidad, proporcionará una herramienta de diagnóstico que puede añadirse a, o definir, un diagnóstico de una enfermedad, un pronóstico del curso de una enfermedad, una determinación de una etapa de la enfermedad, o una susceptibilidad a una enfermedad, que es el resultado de la subexpresión, sobreexpresión o expresión alterada del polinucleótido. Los organismos, particularmente organismos infecciosos, que portan mutaciones en dicho polinucleótido pueden detectarse al nivel de polinucleótido mediante una variedad de técnicas, tales como las descritas en otro lugar de la presente memoria.

Las células de un organismo que porta mutaciones o polimorfismos (variaciones alélicas) en un polinucleótido y/o polipéptido de la invención pueden detectarse también al nivel de polinucleótido o polipéptido mediante una variedad de técnicas para permitir, por ejemplo, el serotipado. Por ejemplo, puede usarse PCR-FI para detectar mutaciones en el ARN. Se prefiere particularmente usar PCR-FI junto con sistemas de detección automatizada tales como, por ejemplo, GeneScan. Pueden usarse también ARN, ADNc o ADN genómico con el mismo fin, PCR. Como ejemplo, pueden usarse cebadores de PCR complementarios de un polinucleótido que codifica un polipéptido BASB205 para identificar y analizar mutaciones.

La invención se refiere adicionalmente a cebadores con 1, 2, 3 ó 4 nucleótidos retirados del extremo 5' y/o 3'. Estos cebadores pueden usarse, entre otras cosas, para amplificar ADN y/o ARN de BASB205 aislado de una muestra derivada de un individuo, tal como material corporal. Los cebadores pueden usarse para amplificar un polinucleótido aislado de un individuo afectado de tal modo que el polinucleótido pueda someterse entonces a diversas técnicas para la elucidación de la secuencia polinucleotídica. De este modo, pueden detectarse mutaciones en la secuencia polinucleotídica y usarse para diagnosticar y/o pronosticar la infección o su etapa o curso, o para serotipar y/o clasificar el agente infeccioso.

La invención se refiere adicionalmente a un proceso para diagnosticar una enfermedad, preferiblemente infecciones bacterianas, más preferiblemente infecciones causadas por *H. influenzae* no tipable, que comprende determinar a partir de una muestra derivada de un individuo, tal como un material corporal, un nivel aumentado de expresión de polinucleótido que tiene una secuencia de cualquiera de las secuencias del grupo 1 de SEC. La expresión aumentada o reducida de polinucleótido BASB205 puede medirse usando uno cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica para la cuantificación de polinucleótidos tales como, por ejemplo, amplificación, PCR, PCR-FI, protección de ARNasa, transferencia Northern, espectrometría y otros procedimientos de hibridación.

Además, puede usarse un ensayo de diagnóstico según la invención para detectar la sobreexpresión de polipéptido BASB205 en comparación con muestras de tejido de control normal para detectar la presencia de una infección, por ejemplo. Las técnicas de ensayo que pueden usarse para determinar los niveles de polipéptido BASB205 en una muestra derivada de un hospedador, tal como material corporal, son bien conocidas por los expertos en la técnica. Dichos procedimientos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de transferencia Western, ensayos de anticuerpo sándwich, detección de anticuerpo y ensayos ELISA.

Los polinucleótidos de la invención pueden usarse como componentes de matrices polinucleotídicas, preferiblemente matrices de alta densidad o rejillas. Estos ensayos de alta densidad son particularmente útiles con fines de diagnóstico y pronóstico. Por ejemplo, puede usarse un conjunto de puntos que comprende cada uno un gen diferente, y que comprende adicionalmente un polinucleótido o polinucleótidos de la invención, para sondear, tal como usando hibridación o amplificación de ácido nucleico usando una sonda obtenida o derivada de una muestra corporal, para determinar la presencia de una secuencia polinucleotídica particular o secuencia relacionada en un individuo. Dicha presencia puede indicar la presencia de un patógeno, particularmente *Haemophilus influenzae* no tipable, y puede ser útil para diagnosticar y/o pronosticar la enfermedad o el curso de una enfermedad. Se prefiere una rejilla que comprende una serie de variantes de cualquier secuencia polinucleotídica del grupo 1 de SEC. Se prefiere también una serie de variantes de una secuencia polinucleotídica que codifican cualquier secuencia polipeptídica del grupo 2 de SEC.

### Anticuerpos

Pueden usarse los polipéptidos y polinucleótidos de la invención o variantes de los mismos o células que expresan los mismos como inmunógenos para producir anticuerpos inmunoespecíficos de dichos polipéptidos o polinucleótidos respectivamente. Como alternativa, pueden usarse también mimotopos, particularmente mimotopos peptídicos, de epítopos en la secuencia polipeptídica como inmunógenos para producir anticuerpos inmunoespecíficos del polipéptido

de la invención. El término “inmuno-específico” significa que los anticuerpos tienen sustancialmente mayor afinidad por los polipéptidos de la invención que su afinidad por otros polipéptidos relacionados de la técnica anterior.

5 En ciertos aspectos preferidos de la invención, se dan a conocer anticuerpos contra polipéptidos o polinucleótidos BASB205.

10 Los anticuerpos generados contra los polipéptidos o polinucleótidos de la invención pueden obtenerse administrando los polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención, o fragmentos que portan epítipo de cualquiera o ambos, análogos de cualquiera o ambos, o células que expresan cualquier o ambos, a un animal, preferiblemente no humano, usando protocolos rutinarios. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica conocida en la técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de línea celular continua. Los ejemplos incluyen diversas técnicas tales como aquellas de Kohler, G. y Milstein, C., *Nature* 256: 495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, pág. 77-96 en “MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY”, Alan R. Liss, Inc. (1985).

15 Las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de EE.UU. n° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios de polipéptidos o polinucleótidos de esta invención. También pueden usarse ratones transgénicos, u otros organismos o animales, tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados inmuno-específicos de los polipéptidos o polinucleótidos de la invención.

20 Como alternativa, puede utilizarse la tecnología de presentación en fagos para seleccionar genes de anticuerpo con actividades de unión a un polipéptido de la invención de repertorios de genes *v* amplificados por PCR de linfocitos de seres humanos cribados por poseer anti-BASB205 o de bibliotecas no infectadas (McCafferty, *et al.*, (1990), *Nature* 348, 552-554; Marks, *et al.*, (1992) *Biotechnology* 10, 779-783). La afinidad de estos anticuerpos puede mejorarse también, por ejemplo, mediante intercambio de cadenas (Clackson *et al.*, (1991) *Nature* 352: 628).

25 Los anticuerpos anteriormente descritos pueden emplearse para aislar o identificar clones que expresan los polipéptidos o polinucleótidos de la invención purificando los polipéptidos o polinucleótidos, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad.

30 Por tanto, entre otros, los anticuerpos contra polipéptidos BASB205 o polinucleótidos BASB205 pueden emplearse para tratar infecciones, particularmente infecciones bacterianas.

35 Las variantes polipeptídicas incluyen variantes antigénica, epitópica o inmunológicamente equivalentes de un aspecto particular de esta invención.

40 Preferiblemente, el anticuerpo o variante del mismo se modifica para hacerlo menos inmunogénico en el individuo. Por ejemplo, si el individuo es humano, el anticuerpo puede “humanizarse” lo más preferiblemente, con lo que la región o regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo derivado de hibridoma se han transplantado a un anticuerpo monoclonal humano, por ejemplo, como se describe en Jones *et al.* (1986), *Nature* 321, 522-525 o Tempest *et al.*, (1991) *Biotechnology* 9, 266-273.

#### *Antagonista y agonistas- ensayos y moléculas*

45 Los polipéptidos y polinucleótidos de la invención pueden usarse también para evaluar la unión de sustratos y ligandos de molécula pequeña a, por ejemplo, células, preparaciones exentas de células, bibliotecas 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 *et al.*, *Current Protocols in Immunology* 1 (2): capítulo 5 (1991).

50 Los procedimientos de cribado pueden ser 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 mediante un marcaje asociado directa o indirectamente al compuesto candidato. Como alternativa, el procedimiento de cribado puede implicar la competición con un competidor marcado. Adicionalmente, estos procedimientos de cribado pueden ensayar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por la activación o inhibición del polipéptido o polinucleótido usando sistemas de detección apropiados para las células que comprenden el polipéptido o polinucleótido. Los inhibidores de la activación se ensayan generalmente en presencia de un agonista conocido y se observa el efecto sobre la activación del agonista en presencia del compuesto candidato. Pueden emplearse polipéptido constitutivamente activo y/o polipéptidos y polinucleótidos constitutivamente expresados en procedimientos de cribado para agonistas inversos o inhibidores, en ausencia de un agonista o inhibidor, ensayando si el compuesto candidato da como resultado la inhibición del polipéptido o polinucleótido, según sea el caso. Adicionalmente, los procedimientos de cribado pueden comprender simplemente las etapas de mezclar un compuesto candidato con una solución que contiene un polipéptido o polinucleótido de la presente invención, formando una mezcla, medir la actividad de polipéptido y/o polinucleótido BASB205 en la mezcla y comparar la actividad de polipéptido y/o polinucleótido BASB205 de la mezcla con un patrón. Pueden usarse también proteínas de fusión, tales como aquellas preparadas a partir de la porción Fc y el polipéptido BASB205 como se describe a continuación en la presente memoria, para ensayos de cribado de alto rendimiento para identificar antagonistas del polipéptido de la presente invención, así como polipéptidos filogenética y/o funcionalmente relacionados (véase D. Bennett *et al.*, *J. Mol. Recognition*, 8: 52-58 (1995); y K. Johanson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270 (16): 9459-9471 (1995)).

## ES 2 305 111 T3

Los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos que se unen a y/o interactúan con un polipéptido de la presente invención pueden usarse también para configurar procedimientos de cribado para detectar el efecto de compuestos añadidos sobre la producción de ARNm y/o polipéptido en células. Por ejemplo, puede construirse un ensayo ELISA para medir los niveles de polipéptido secretado o asociado a célula usando anticuerpos monoclonales y policlonales mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica. Esto puede usarse para descubrir agentes que pueden inhibir o potenciar la producción de polipéptido (también denominados antagonistas o agonistas, respectivamente) de células o tejidos manipulados adecuadamente.

La invención se refiere también a un procedimiento de cribado de compuestos para identificar aquellos que potencian (agonista) o bloquean (antagonista) la acción de polipéptidos o polinucleótidos BASB205, particularmente aquellos compuestos que son bacteriostáticos y/o bactericidas.

El procedimiento de cribado puede implicar técnicas de alto rendimiento. Por ejemplo, para cribar agonistas o antagonistas, se incubaba una mezcla de reacción sintética, un compartimento celular tal como una membrana, cubierta celular o pared celular, o una preparación de cualquiera de los mismos que comprende polipéptido BASB205 y un sustrato o ligando marcado de dicho polipéptido en ausencia o presencia de una molécula candidato que puede ser un agonista o antagonista de BASB205. La capacidad de la molécula candidato de agonizar o antagonizar el polipéptido BASB205 se refleja en una unión reducida del ligando marcado o una producción reducida del producto de dicho sustrato. Es más probable que las moléculas que se unen libremente, concretamente sin inducir los efectos del polipéptido BASB205, sean buenos antagonistas. Las moléculas que se unen bien y, según el caso, aumentan la velocidad de producción de producto del sustrato, aumentan la transducción de señal o aumentan la actividad del canal químico, son agonistas. La detección de la velocidad o nivel, según sea el caso, de producción de producto a partir del sustrato, transducción de señal o actividad de canal químico puede potenciarse usando un sistema indicador. Los sistemas indicadores que pueden ser útiles a este respecto incluyen, pero sin limitación, sustrato marcado colorimétricamente convertido en producto, un gen indicador que es sensible a cambios en la actividad del polinucleótido o polipéptido BASB205 y ensayos de unión conocidos en la técnica.

Es otro ejemplo de un ensayo de agonistas de BASB205 un ensayo competitivo que combina BASB205 y un agonista potencial con moléculas de unión a BASB205, moléculas de unión a BASB205 recombinante, sustratos o ligandos naturales o miméticos de ligando, en las condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitivo. BASB205 puede estar marcado, tal como mediante radiactividad o un compuesto colorimétrico, de tal modo que pueda determinarse exactamente el número de moléculas de BASB205 unidas a una molécula de unión o convertidas en producto para evaluar 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 de la invención e inhiben o anulan así su actividad o expresión. Los antagonistas potenciales pueden ser también moléculas orgánicas pequeñas, un péptido, un polipéptido tal como una proteína estrechamente relacionada o anticuerpo que se une a los mismos sitios en una molécula de unión, tal como una molécula de unión, sin inducir las actividades inducidas por BASB205, evitando así la acción o expresión de polipéptidos y/o polinucleótidos BASB205 excluyendo a los polipéptidos y/o polinucleótidos BASB205 de la unión.

Los antagonistas potenciales incluyen una molécula pequeña que se une a y ocupa el sitio de unión del polipéptido, evitando así la unión a moléculas de unión celular, de tal modo que se evita la actividad biológica. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero sin limitación, 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). Los antagonistas potenciales preferidos incluyen compuestos relacionados con y variantes de BASB205.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a proteínas de fusión solubles modificadas por ingeniería genética que comprenden un polipéptido de la presente invención, o un fragmento del mismo, y diversas porciones de las regiones constantes de cadenas pesadas o ligeras de inmunoglobulinas de diversas subclases (IgG, IgM, IgA, IgE). Se prefiere como inmunoglobulina la parte constante de la cadena pesada de IgG humana, particularmente IgG1, en la que la fusión tiene lugar en la región bisagra. En una realización particular, la parte Fc puede retirarse simplemente mediante la incorporación de una secuencia de escisión que puede escindirse con el factor de coagulación sanguínea Xa. Además, esta invención se refiere a procesos para la preparación de estas proteínas de fusión mediante ingeniería genética, y al uso de las mismas para cribado de medicamentos, diagnóstico y terapia. Un aspecto adicional de la invención se refiere también a polinucleótidos que codifican dichas proteínas de fusión. Pueden encontrarse ejemplos de tecnología de proteína de fusión en las solicitudes de patente internacional n° WO94/29458 y WO94/22914.

Cada una de las secuencias polinucleotídicas proporcionadas en la presente memoria puede usarse en el descubrimiento y desarrollo de compuestos antibacterianos. La proteína codificada, tras la expresión, puede usarse como diana para el cribado de medicamentos antibacterianos. Adicionalmente, pueden usarse las secuencias polinucleotídicas que codifican las regiones aminoterminales de la proteína codificada o de Shine-Delgarno u otras secuencias facilitadoras de la traducción del ARNm respectivo para construir secuencias antisentido para controlar la expresión de la secuencia de codificación de interés.

## ES 2 305 111 T3

La invención se refiere también al uso del polipéptido, polinucleótido, agonista o antagonista de la invención para interferir con la interacción física inicial entre un patógeno o patógenos y un hospedador eucariótico, preferiblemente mamífero, responsable de secuelas de la infección. En particular, las moléculas de la invención pueden usarse: en la prevención de la adhesión de bacterias, en particular, bacterias grampositivas y/o gramnegativas, a proteínas de matriz extracelular eucarióticas, preferiblemente de mamífero, en dispositivos de implante o a proteínas de matriz extracelulares en heridas; para bloquear la adhesión bacteriana entre proteínas de matriz extracelular eucarióticas, preferiblemente de mamífero, y proteínas bacterianas BASB205 que median el daño tisular y/o, para bloquear la progresión normal de la patogénesis en infecciones iniciadas de otro modo que por la implantación de los dispositivos de implante o por otras técnicas quirúrgicas.

Según aún otro aspecto de la invención, se dan a conocer agonistas o antagonistas de BASB205, preferiblemente agonistas y antagonistas bacteriostáticos o bactericidas.

Los antagonistas y agonistas de la invención pueden emplearse, por ejemplo, para prevenir, inhibir y/o tratar enfermedades.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a mimotopos del polipéptido de la invención. Un mimotopo es una secuencia peptídica suficientemente similar al péptido nativo (secuencial o estructuralmente) que puede ser reconocida por anticuerpos que reconocen al péptido nativo; o que es capaz de originar anticuerpos que reconocen al péptido nativo cuando se acoplan a un portador adecuado.

Los mimotopos peptídicos pueden diseñarse con un fin particular mediante la adición, delección o sustitución de aminoácidos seleccionados. Por tanto, los péptidos pueden modificarse con el fin de facilitar la conjugación a un portador proteico. Por ejemplo, puede ser deseable para algunos procedimientos de conjugación química incluir una cisteína terminal. Además, puede ser deseable para los péptidos conjugados con un portador proteico incluir un extremo hidrófobo distal del extremo conjugado del péptido, de tal modo que el extremo libre no conjugado del péptido permanezca asociado a la superficie de la proteína portadora, presentando así el péptido en una configuración que se parece muy estrechamente a la del péptido como se encuentra en el contexto de la molécula nativa completa. Por ejemplo, los péptidos pueden alterarse para tener una cisteína N-terminal y una cola amidada hidrófoba C-terminal. Como alternativa, puede realizarse la adición o sustitución de una forma de estereómero D de uno o más de los aminoácidos (secuencias inversas) para crear un derivado beneficioso, por ejemplo, para potenciar la estabilidad del péptido. Los mimotopos pueden ser también retrosecuencias de las secuencias peptídicas naturales en las que la orientación de secuencia está invertida. Los mimotopos pueden ser también de carácter retroinverso. Se describen retro-, inverso- y retroinversopéptidos en los documentos WO 95/24916 y WO 94/05311.

Como alternativa, los mimotopos peptídicos pueden identificarse usando anticuerpos que son capaces de unirse por sí mismos a los polipéptidos de la presente invención usando técnicas tales como tecnología de presentación en fago (documento EP 0.552.267 B1). Esta técnica genera un gran número de secuencias peptídicas que imitan la estructura de los péptidos nativos y, por lo tanto, son capaces de unirse a anticuerpos anti-péptido nativo, pero 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, preferiblemente seres humanos, que comprende inocular al individuo polinucleótido y/o polipéptido BASB205, o un fragmento o variante del mismo, adecuado para producir una respuesta inmunitaria de anticuerpo y/o linfocito T para proteger a dicho individuo de infección, particularmente infección bacteriana y lo más particularmente infección por *H. influenzae* no tipable. Se proporcionan también procedimientos mediante los cuales dicha respuesta inmunitaria retarda la replicación bacteriana. Aún otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de inducción de la respuesta inmunitaria en un individuo que comprende suministrar a dicho individuo un vector de ácido nucleico, secuencia o ribozima para la expresión directa de polinucleótido y/o polipéptido BASB205, o un fragmento o variante del mismo, para expresar un polinucleótido y/o polipéptido BASB205, o un fragmento o variante del mismo *in vivo* para inducir una respuesta inmunitaria tal como producir una respuesta inmunitaria de anticuerpo y/o linfocitos T incluyendo, por ejemplo, linfocitos T productores de citocina o linfocitos T citotóxicos, para proteger dicho individuo, preferiblemente un ser humano, de la enfermedad, tanto si la enfermedad está ya establecida en el individuo como si no. Es un ejemplo de administración del gen acelerarlo en las células deseadas en forma de recubrimiento de partículas o de otro modo. Dicho vector de ácido nucleico 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, preferiblemente un ser humano, en el que se puede inducir una respuesta inmunitaria, induce una respuesta inmunitaria en dicho individuo frente a polinucleótido y/o polipéptido BASB205 codificado por el mismo, en el que la composición comprende un polinucleótido y/o polipéptido BASB205 recombinante y/o comprende ADN y/o ARN que codifica y expresa un antígeno de dicho polinucleótido BASB205, polipéptido codificado por el mismo u otro polipéptido de la invención. La respuesta inmunitaria puede usarse terapéutica o profilácticamente y puede tomar la forma de inmunidad de anticuerpo y/o inmunidad celular, tal como inmunidad celular que surge de linfocitos T CTL o CD4+.

Puede fusionarse un polipéptido BASB205 o un fragmento del mismo con una coproteína o resto químico que puede o no producir por sí mismo anticuerpos, pero que es capaz de estabilizar la primera proteína y producir una proteína fusionada o modificada que tendrá propiedades antigénicas y/o inmunogénicas, y preferiblemente propiedades protectoras. Por tanto, la proteína recombinante fusionada preferiblemente comprende adicionalmente una coproteína antigénica tal como lipoproteína D de *Haemophilus influenzae*, glutatión-S-transferasa (GST) o beta-galactosidasa, o cualquier otra coproteína relativamente grande que solubilice la proteína y facilite la producción y purificación de la misma. Además, la coproteína puede actuar como coadyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmunitario del organismo que recibe la proteína. La coproteína puede estar unida al extremo amino o carboxi de la primera proteína.

En una composición de vacuna según la invención, un polipéptido y/o polinucleótido BASB205, o un fragmento, o mimotopo o variante del mismo, puede estar presente en un vector tal como los vectores recombinantes vivos descritos anteriormente, por ejemplo, vectores bacterianos vivos.

Son también adecuados vectores no vivos para el polipéptido BASB205, por ejemplo, vesículas bacterianas de membrana externa o "flictenas". Las flictenas de ME derivan de la membrana externa de la membrana bicapa de bacterias gramnegativas y se han documentado en muchas bacterias gramnegativas (Zhou, L *et al.* 1998. *FEMS Microbiol. Lett.* 163: 223-228) incluyendo *C. trachomatis* y *C. psittaci*. Una lista no exhaustiva de patógenos bacterianos que se informa que producen flictenas incluye también: *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 flictenas tienen la ventaja de proporcionar proteínas de membrana externa en su conformación nativa y son por tanto particularmente útiles para vacunas. Las flictenas pueden mejorarse también para uso de vacuna modificando por ingeniería genética la bacteria para modificar la expresión de una o más moléculas de la membrana externa. Por tanto, por ejemplo, puede introducirse o regularse positivamente la expresión de una proteína inmunogénica deseada en la membrana externa, tal como el polipéptido BASB205 (por ejemplo, alterando el promotor). En lugar o además de la adición, puede regularse negativamente la expresión de moléculas de membrana externa que son irrelevantes (por ejemplo, antígenos no protectores o proteínas inmunodominantes pero variables) o perjudiciales (por ejemplo, moléculas tóxicas tales como LPS o inductores potenciales de una respuesta inmunitaria). Estos enfoques se discuten con más detalle a continuación. Las regiones flanqueantes no codificantes del gen BASB205 contienen elementos reguladores importantes en la expresión del gen. Esta regulación tiene lugar tanto al nivel transcripcional como traduccional. La secuencia de estas regiones, tanto cadena arriba como cadena abajo del marco abierto de lectura del gen, puede obtenerse mediante secuenciación de ADN. Esta información de secuencia permite la determinación de motivos reguladores potenciales tales como los diferentes elementos promotores, secuencias terminadoras, elementos de secuencia inducibles, represores, elementos responsables de la variación de fase, la secuencia Shine-Dalgarno, regiones con estructura secundaria potencial implicada en la regulación, así como otros tipos de motivos o secuencias reguladores. Esta secuencia es un aspecto adicional de la invención. Además, la SÉC N° ID 13 es la secuencia cadena arriba de *Haemophilus influenzae* no tipable (cadena arriba del codón de iniciación predicho de los genes preferidos) que comprende aproximadamente 1000 pb.

Esta información de secuencia permite la modulación de la expresión natural del gen BASB205. La regulación positiva de la expresión génica puede conseguirse alterando el promotor, la secuencia de Shine-Dalgarno, los elementos represores u operadores potenciales, o cualquier otro elemento implicado. Igualmente, la regulación negativa de la expresión puede conseguirse mediante tipos similares de modificación. Como alternativa, al cambiar las secuencias de variación de fase, la expresión del gen puede ponerse bajo el control de la variación de fase, o puede desacoplarse de esta regulación. En otro enfoque, la expresión del gen puede ponerse bajo el control de uno o más elementos inducibles que permitan una expresión regulada. Los ejemplos de dicha regulación incluyen, pero sin limitación, la inducción por desplazamiento de temperatura, la adición de sustratos inductores como carbohidratos seleccionados o sus derivados, elementos traza, vitaminas, cofactores, metales iónicos, etc.

Dichas modificaciones como se describen anteriormente pueden introducirse por varios medios diferentes. La modificación de secuencias implicadas en la expresión génica puede llevarse a cabo *in vivo* mediante mutagénesis aleatoria seguida de selección del fenotipo deseado. Otro enfoque consiste en aislar la región de interés y modificarla mediante mutagénesis aleatoria, o mutagénesis de reemplazo, inserción o delección dirigida a sitio. La región modificada puede reintroducirse entonces en el genoma bacteriano mediante recombinación homóloga, y evaluarse el efecto sobre la expresión génica. En otro enfoque, puede usarse el conocimiento de la secuencia de la región de interés para reemplazar o eliminar todas o parte de las secuencias reguladoras naturales. En este caso, la región reguladora diana se aísla y modificada para contener 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 secuencias reguladoras de tipo salvaje. Estas secuencias modificadas pueden reintroducirse en la bacteria mediante recombinación homóloga en el genoma. Una lista no exhaustiva de promotores preferidos que podrían usarse para la regulación positiva de la expresión génica incluye los promotores porA, porB, IbpB, tpbB, p110, Ist, hpuAB de *N. meningitidis* o *N. gonorrhoeae*; ompCD, copB, IbpB, ompE, UspA1; UspA2; TbpB de *M. catarrhalis*; p1, p2, p4, p5, p6, IpD, tpbB, D15, Hia, Hmw1, Hmw2 de *H. influenzae*.

## ES 2 305 111 T3

En un ejemplo, puede modularse la expresión del gen intercambiando su promotor por un promotor más fuerte (mediante el aislamiento de la secuencia cadena arriba del gen, modificación *in vitro* de esta secuencia y reintroducción en el genoma mediante recombinación homóloga). La expresión regulada positivamente puede obtenerse tanto en bacteria como en vesículas de membrana externa desprendidas (o creadas) por la bacteria. En otros ejemplos, los enfoques descritos pueden usarse para generar cepas bacterianas recombinantes con características mejoradas para aplicaciones de vacuna. Éstas pueden ser, pero sin limitación, cepas atenuadas, cepas con expresión aumentada de antígenos seleccionados, cepas con desactivación (o expresión reducida) de genes que interfieren con la respuesta inmunitaria, cepas con expresión modulada de proteínas inmunodominantes, cepas con desprendimiento modulado de vesículas de membrana externa.

Por tanto, se da a conocer también por la invención una región cadena arriba modificada del gen BASB205, conteniendo dicha región cadena arriba modificada un elemento regulador heterólogo que altera el nivel de expresión de la proteína BASB205 localizada en la membrana externa. La región cadena arriba según este aspecto de la invención incluye la secuencia cadena arriba del gen BASB205. La región empieza inmediatamente cadena arriba del gen BASB205 y continúa habitualmente hasta una posición de no más de aproximadamente 1000 pb cadena arriba del gen desde el codón de inicio ATG. En el caso de un gen localizado en una secuencia policistónica (operón), la región cadena arriba puede empezar inmediatamente antes del gen de interés, o antes del primer gen del operón. Preferiblemente, una región cadena arriba modificada según este aspecto de la invención contiene un promotor heterólogo en una posición entre 500 y 700 pb cadena arriba del ATG.

El uso de las regiones cadena arriba dadas a conocer para regular positivamente la expresión del gen BASB205, un proceso para conseguir esto mediante recombinación homóloga (por ejemplo, como se describe en el documento WO 01/09350 incorporado como referencia a la presente memoria), un vector que comprende una secuencia cadena arriba adecuada con este fin, y una célula hospedadora así alterada son todos aspectos adicionales de esta invención.

Por tanto, la invención se refiere a un polipéptido BASB205 en una flictena bacteriana modificada. La invención se refiere adicionalmente a células hospedadoras modificadas capaces de producir vectores de flictena basada en membrana no vivos. La invención se refiere adicionalmente a vectores de ácido nucleico que comprenden el gen BASB205 que tienen una región cadena arriba modificada que contiene un elemento regulador heterólogo.

Se describen adicionalmente por la invención procesos para preparar las células hospedadoras y flictenas bacterianas según la invención.

Se proporcionan también por esta invención composiciones, particularmente composiciones de vacuna, y procedimientos que comprenden los polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención y secuencias de ADN inmunoestimulantes tales como las descritas en Sato, Y. *et al. Science* 273: 352 (1996).

Se proporcionan también por esta invención procedimientos que usan el polinucleótido descrito, o fragmentos particulares del mismo, que se ha mostrado que codifican regiones no variables de proteínas de superficie de célula bacteriana en constructos polinucleotídicos usados en dichos experimentos de inmunización genética en modelos animales de infección con *H. influenzae* no tipable. Dichos experimentos serán particularmente útiles para identificar epítomos proteicos capaces de provocar una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica. Se cree que este enfoque permitirá la preparación posterior de anticuerpos monoclonales particularmente valiosos, derivados del órgano necesario del animal que resiste o depura exitosamente la infección, para el desarrollo de agentes profilácticos o tratamientos terapéuticos de la infección bacteriana, particularmente infección por *H. influenzae* no tipable, en mamífero, particularmente seres humanos.

La invención incluye también una formulación de vacuna que comprende un polipéptido y/o polinucleótido recombinante inmunogénico de la invención junto con un portador adecuado, tal como un portador farmacéuticamente aceptable. Puesto que los polipéptidos y polinucleótidos pueden degradarse en el estómago, se administra preferiblemente cada uno por vía parenteral incluyendo, por ejemplo, administración subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, compuestos bacteriostáticos y solutos que vuelven la formulación isotónica con el fluido corporal, preferiblemente la sangre, del individuo; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en estado liofilizado que requiere sólo la adición del portador líquido estéril inmediatamente antes del uso.

La formulación de vacuna de la invención puede incluir también sistemas coadyuvantes para potenciar la inmunogenicidad de la formulación. Preferiblemente, el sistema coadyuvante origina preferiblemente una respuesta de tipo TH1.

Una respuesta inmunitaria puede distinguirse ampliamente en dos categorías extremas, que son las respuestas inmunitarias humoral o mediada por célula (tradicionalmente caracterizadas por mecanismos de protección efectores de anticuerpo y celulares, respectivamente). Estas categorías de respuesta se han denominado respuestas de tipo TH1 (respuesta mediada por célula) y respuestas inmunitarias de tipo TH2 (respuesta humoral).

## ES 2 305 111 T3

Las respuestas inmunitarias extremas de tipo TH1 pueden caracterizarse por la generación de linfocitos T citotóxicos de haplotipo limitado específicos de antígeno y respuestas de linfocitos citolíticos naturales. En ratones, las respuestas de tipo TH1 se caracterizan a menudo por la generación de anticuerpos del subtipo IgG2a, mientras que en seres humanos estos corresponden a anticuerpos de tipo IgG1. Las respuestas inmunitarias de tipo TH2 se caracterizan por la generación de un amplio intervalo de isotipos de inmunoglobulina que incluyen en ratones IgG1, IgA e IgM.

Puede considerarse que la fuerza impulsora detrás del desarrollo de estos dos tipos de respuestas inmunitarias son las citocinas. Niveles altos de citocinas de tipo TH1 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por célula frente el antígeno dado, mientras que altos niveles de citocinas de tipo TH2 tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunitarias humorales frente el antígeno.

La distinción entre las respuestas inmunitarias de tipo TH1 y TH2 no es absoluta. En realidad, un individuo soportará una respuesta inmunitaria que se describe como predominantemente TH1 o predominantemente TH2. Sin embargo, a menudo es conveniente considerar las familias de citocinas en términos de lo descrito en los clones de linfocitos T CD4 +ve de murina 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, pág.145-173). Tradicionalmente, las respuestas de tipo TH1 están asociadas a la producción de citocinas INF- $\gamma$  e IL-2 por linfocitos T. Otras citocinas a menudo asociadas a la inducción de respuestas inmunitarias de tipo TH1 no se producen por linfocitos T, tales como IL-12. En contraposición, las respuestas de tipo TH2 están asociadas a la secreción de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13.

Es conocido que ciertos coadyuvantes de vacuna son particularmente adecuados para la estimulación de repuestas de citocina 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 medida directa de la producción de citocinas TH1 o TH2 por linfocitos T *in vitro* después de reestimulación con antígeno, y/o la medida de la relación IgG1:IgG2a de respuestas de anticuerpo específicas de antígeno.

Por tanto, un coadyuvante de tipo TH1 es aquel que estimula preferiblemente a poblaciones de linfocitos T aisladas a producir altos niveles de citocinas de tipo TH1 cuando se reestiman con antígeno *in vitro*, y promueve el desarrollo tanto de linfocitos T citotóxicos CD8+ como respuestas de inmunoglobulina específica de antígeno asociadas al isotipo TH1.

Se describen coadyuvantes que son capaces de estimulación preferencial de la respuesta celular TH1 en las solicitudes de patente internacional nº WO 94/00153 y WO 95/17209. El monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL) es uno de dichos coadyuvantes. Este es conocido por el documento GB 2220211 (Ribi). Químicamente, es una mezcla de monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas y se fabrica por Ribi Immunochem, Montana. Se da a conocer una forma preferida de monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado en la patente europea 0.689.454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

Preferiblemente, las partículas de 3D-MPL son suficientemente pequeñas para esterilizarse por filtración a través de una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (patente europea número 0.689.454). El 3D-MPL estará presente en el intervalo de 10  $\mu\text{g}$ -100  $\mu\text{g}$ , preferiblemente 25-50  $\mu\text{g}$  por dosis, en el que el antígeno estará típicamente presente en un intervalo de 2-50  $\mu\text{g}$  por dosis.

Otro coadyuvante preferido comprende QS21, una fracción no tóxica purificada por HPLC derivada de la corteza de *Quillaja Saponaria Molina*. Opcionalmente, éste puede mezclarse con monofosforil-lípido A 3-des-O-acilado (3D-MPL), opcionalmente junto con un portador.

Se da a conocer el procedimiento de producción de QS21 en la patente de EE.UU. nº 5.057.540.

Se han descrito anteriormente formulaciones coadyuvantes no reactogénicas que contienen QS21 (documento WO 96/33739). Se ha mostrado que dichas formulaciones que comprenden QS21 y colesterol son coadyuvantes estimulantes de TH1 exitosos cuando se formulan junto con un antígeno.

Los coadyuvantes adicionales que son estimulantes preferidos de respuesta celular TH1 incluyen oligonucleótidos inmunomoduladores, por ejemplo, secuencias de CpG no metiladas como se dan a conocer en el documento WO 96/02555.

Se contemplan también combinaciones de diferentes coadyuvantes estimulantes de TH1, tales como aquellos mencionados anteriormente en la presente memoria, para proporcionar un coadyuvante que es un estimulante preferido de la respuesta celular TH1. Por ejemplo, puede formularse QS21 junto con 3D-MPL. La relación de QS21:3D-MPL será típicamente del orden de 1 : 10 a 10 : 1; preferiblemente de 1 : 5 a 5 : 1 y a menudo sustancialmente de 1 : 1. El intervalo preferido para sinergia óptima es de 2,5 : 1 a 1 : 1 de 3D-MPL: QS21.

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

## ES 2 305 111 T3

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 de la composición de vacuna según la invención se combinan con QS21 y 3D-MPL en dicha emulsión. Adicionalmente, la emulsión de aceite en agua puede contener Span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

Típicamente, para administración humana estarán presentes QS21 y 3D-MPL en una vacuna en el intervalo de 1  $\mu\text{g}$ -200  $\mu\text{g}$ , tal como 10-100  $\mu\text{g}$ , preferiblemente 10  $\mu\text{g}$ -50  $\mu\text{g}$  por dosis. Típicamente, el aceite en agua comprenderá de 2 a 10% de escualeno y de 2 a 10% de alfa-tocoferol y de 0,3 a 3% de Tween 80. Preferiblemente, la relación de escualeno:alfa-tocoferol es igual o menor a 1, ya que proporciona una emulsión más estable. Puede estar presente también Span 85 a un nivel de un 1%. En algunos casos, puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan adicionalmente un estabilizante.

Las emulsiones de aceite en agua no tóxicas contienen preferiblemente un aceite no tóxico, por ejemplo escualano o escualeno, un emulsionante, por ejemplo Tween 80, en un portador acuoso. El portador acuoso puede ser, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato.

Se describe una formulación coadyuvante particularmente potente que implica QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua en el documento WO 95/17210.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a ciertos polipéptidos y polinucleótidos BASB205, ha de entenderse que ésta cubre fragmentos de los polipéptidos y polinucleótidos de origen natural, y polipéptidos y polinucleótidos similares con adiciones, deleciones o sustituciones que no afectan sustancialmente a las propiedades inmunogénicas de los polipéptidos o polinucleótidos recombinantes. Se describen los fragmentos/péptidos preferidos en el ejemplo 13.

La presente invención proporciona también una composición de vacuna polivalente que comprende una formulación de vacuna de la invención en combinación con otros antígenos, en particular, antígenos útiles para tratar la otitis media. Dicha composición de vacuna polivalente puede incluir un coadyuvante inductor de TH1 como se describe anteriormente en la presente memoria.

En una realización preferida, los polipéptidos, fragmentos e inmunógenos de la invención se formulan con uno o más de los siguientes grupos de antígenos: a) uno o más polisacáridos capsulares neumocócicos (solos o conjugados con una proteína portadora); b) uno o más antígenos que pueden proteger a un hospedador frente a infección por *M. catarrhalis*; c) uno o más antígenos proteicos que pueden proteger a un hospedador frente a infección por *Streptococcus pneumoniae*; d) uno o más antígenos proteicos de *Haemophilus influenzae* no tipable 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). Dichas vacunas pueden usarse ventajosamente como vacunas de otitis media globales.

Los antígenos polisacáridos capsulares neumocócicos se seleccionan preferiblemente de 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 preferiblemente de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F).

Los antígenos proteicos neumocócicos preferidos son aquellas proteínas neumocócicas que se exponen en la superficie externa del neumococo (capaces de ser reconocidas por el sistema inmune del hospedador durante al menos parte del ciclo vital del neumococo), o son proteínas que se secretan o liberan por el neumococo. Lo más preferiblemente, la proteína es una toxina, adhesina, transductora de señal de dos componentes o lipoproteína de *Streptococcus pneumoniae*, o fragmentos de las mismas. Las proteínas particularmente preferidas incluyen, pero sin limitación: neumolisina (preferiblemente detoxificada mediante tratamiento químico o mutación) [Mitchell *et al. Nucleic Acids Res.* 11 de julio de 1990; 18 (13): 4010 "Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2.", Mitchell *et al. Biochim Biophys Acta*, 23 de enero de 1989; 1007 (1): 67-72 "Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties", documentos WO 96/05859 (A. Cyanamid), WO 90/06951 (Paton *et al.*), WO 99/03884 (NAVA)]; PspA y variantes de delección transmembrana de la misma (documentos WO 92/14488; WO 99/53940; US 5804193 - Briles *et al.*); PspC y variantes de delección transmembrana de la misma (documentos WO 99/53940; WO 97/09994 - Briles *et al.*); PsaA y variantes de delección transmembrana de la misma (Berry & Paton, *Infect. Immun.* diciembre de 1996; 64 (12): 5255-5262 "Sequence heterogeneity of PsaA, a 37-kilodalton putative adhesin essential for virulence of *Streptococcus pneumoniae*"); proteínas de unión a colina neumocócica y variantes transmembrana de las mismas; CbpA y variantes de delección transmembrana de las mismas (documentos WO 97/41151; WO 99/51266); gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Infect. Immun.* 1996 64: 3544); HSP70 (documento WO 96/40928); PcpA (Sánchez-Beato *et al. FEMS Microbiol. Lett.* 1998, 164: 207-14); proteína similar a M, solicitud de patente SB n° EP 0837130; y adhesina 18627 (solicitud de patente SB n° EP 0834568). Son antígenos proteicos neumocócicos preferidos adicionales aquellos dados a conocer en el documento WO 98/18931, particularmente aquellos seleccionados en los documentos WO 98/18930 y PCT/US99/30390.

Son antígenos proteicos de *Moraxella catarrhalis* preferidos que pueden incluirse en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de otitis media): 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

## ES 2 305 111 T3

y WO 97/32980 (PMC)]; CopB [Helminen ME, *et al.* (1993) *Infect. Immun.* 61: 2003-2010]; UspA1 y/o UspA2 [documento WO 93/03761 (University of 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); OmpLA1 (documento PCT/EP99/06781); Hly3 (documento PCT/EP99/03257) y OmpE.

Los antígenos proteicos de *Haemophilus influenzae* no tipables preferidos adicionales que se pueden incluir en una vacuna de combinación (especialmente para la prevención de la otitis media) incluyen: proteínas de fimbrina [(documento US 5766608 - Ohio State Research Foundation)] y fusiones que comprenden péptidos de las mismas [por ejemplo, fusiones de péptido LB1(f); documentos US 5843464 (OSU) o WO 99/64067]; OMP26 [documento WO 97/01638 (Cortecs)]; P6 [documento EP 281673 (State University of New 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).

Los antígenos del virus de la gripe preferidos incluyen virus enteros, vivos o inactivados, virus de la gripe escindido, crecido en huevos o células MCDK o células Vero o virosomas de la gripe completa (como se describen por R. Gluck, *Vaccine*, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos tales como proteínas HA, NP, NA, o M, o combinaciones de las mismas.

Los antígenos de RSV (virus respiratorio sincitial) preferidos incluyen la glucoproteína F, la glucoproteína G, la proteína HN o derivados de las mismas.

### *Composiciones, kits y administración*

En un aspecto adicional de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden un polinucleótido BASB205 y/o un polipéptido BASB205 para administración a una célula o a un organismo multicelular.

La invención se refiere también a composiciones que comprenden un polinucleótido y/o un polipéptido discutidos en la presente memoria o sus agonistas o antagonistas. Los polipéptidos y polinucleótidos de la invención pueden emplearse en combinación con un portador o portadores no estériles o estériles para uso con células, tejidos u organismos, tales como un portador farmacéutico adecuado para administración a un individuo. Dichas composiciones comprenden, por ejemplo, un aditivo de medios o una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido y/o polinucleótido de la invención y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos portadores pueden incluir, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La formulación debería adecuarse al modo de administración. La invención se refiere adicionalmente a paquetes y kits de diagnóstico y farmacéuticos y a kits que comprenden uno o más envases llenados con uno o más de los ingredientes de las composiciones anteriormente citadas de la invención.

Los polipéptidos, polinucleótidos y otros compuestos de la invención pueden emplearse solos o junto con otros compuestos tales como compuestos terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de cualquier manera eficaz y conveniente, incluyendo, por ejemplo, la administración por vía tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o transdérmica, entre otras.

En terapia o profilácticamente, el agente activo puede administrarse a un individuo en forma de una composición inyectable, por ejemplo, de una dispersión acuosa estéril, preferiblemente isotónica.

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 de la presente invención, péptido agonista o antagonista o compuesto de molécula pequeña, en combinación con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos portadores incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La invención se refiere adicionalmente a paquetes y kits farmacéuticos que comprenden uno o más envases llenados con uno o más de los ingredientes de las composiciones anteriormente mencionadas de la invención. Los polipéptidos, polinucleótidos y otros compuestos de la presente invención pueden emplearse solos o junto con otros compuestos tales como compuestos terapéuticos.

La composición se adaptará a la vía de administración, por ejemplo, por vía sistémica u oral. Las formas preferidas de administración sistémica incluyen inyección, típicamente inyección intravenosa. Pueden usarse otras vías de inyección, tales como subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Los medios alternativos para administración sistémica incluyen administración transmucosa y transdérmica usando penetrantes tales como sales biliares o ácidos fusídicos u otros detergentes. Además, si un polipéptido u otros compuestos de la presente invención pueden formularse en una formulación entérica o encapsulada, puede ser también posible la administración oral. La administración de estos compuestos puede ser también tópica y/o localizada, en forma de pomadas, pastas, geles, soluciones, polvos y similares.

Para administración a mamíferos, y particularmente seres humanos, se espera que el nivel de dosificación diario del agente activo sea de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg, típicamente de aproximadamente 1 mg/kg. El médico determinará en cualquier caso la dosificación real que será más adecuada para un individuo, y variará con la edad, el peso y la respuesta del individuo particular. Las dosificaciones anteriores son ejemplares del caso medio. Puede haber, por supuesto, casos individuales en los que se requieran intervalos de dosificación mayores o menores, y estos están dentro del alcance de esta invención.

El intervalo de dosificación necesario depende de la elección del péptido, la vía de administración, la naturaleza de la afección del sujeto y el criterio del profesional a cargo. Sin embargo, las dosificaciones adecuadas están en el intervalo de 0,1-100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  del sujeto.

Una composición de vacuna está convenientemente en forma inyectable. Pueden emplearse coadyuvantes convencionales para potenciar la respuesta inmunitaria. Una dosis unitaria adecuada para vacunación es de 0,5-5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de antígeno, y dicha dosis se administra preferiblemente 1-3 veces y con un intervalo de 1-3 semanas. Con el intervalo de dosis indicado, no se observará efectos toxicológicos adversos con los compuestos de la invención que evitarían su administración a individuos adecuados.

Sin embargo, han de esperarse amplias variaciones de la dosificación necesaria a la vista de la variedad de compuestos disponibles y de las eficacias diferentes de las diversas vías de administración. Por ejemplo, se esperaría que la administración oral necesitara mayores dosificaciones que la administración intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas estándar para optimización, como es bien entendido en la técnica.

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

Las secuencias polinucleotídicas y polipeptídicas forman una fuente de información valiosa con la que determinar sus estructuras bi- y tridimensionales así como para identificar secuencias adicionales de homología similar. Estos enfoques se facilitan en gran medida almacenando la secuencia en un medio legible por ordenador y usando después los datos almacenados en un programa de estructura macromolecular conocido o para buscar una base de datos de secuencias usando herramientas de búsqueda bien conocidas tales como el paquete de programas GCG.

Se dan a conocer también por la invención procedimientos para el análisis de las secuencias o cadenas de caracteres, particularmente secuencias genéticas o secuencias proteicas codificadas. Los procedimientos de análisis de secuencia preferidos incluyen, por ejemplo, procedimientos de análisis de homología de secuencia tales como análisis de identidad y similitud, análisis de estructura de ADN, ARN y proteína, ensamblaje de secuencia, análisis cladístico, análisis de motivo de secuencia, determinación del marco abierto de lectura, lectura automática de bases de ácidos nucleicos, análisis del uso de codón, recorte de bases de ácidos nucleicos y análisis de pico de cromatograma de secuenciación.

Se da a conocer un procedimiento computerizado para realizar la identificación de homología. Este procedimiento comprende las etapas de: proporcionar una primera secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia de un polinucleótido de la invención en un medio legible por ordenador; y comparar dicha primera secuencia polinucleotídica con al menos una segunda secuencia polinucleotídica o polipeptídica para identificar la homología.

Se da a conocer también un procedimiento computerizado para realizar la identificación de homología, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: proporcionar una primera secuencia polipeptídica que comprende la secuencia de un polipéptido de la invención en un medio legible por ordenador, y comparar dicha primera secuencia polipeptídica con al menos una segunda secuencia polinucleotídica o polipeptídica para identificar la homología.

#### *Definiciones*

“Identidad”, como es conocido en la técnica, es la relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias polinucleotídicas, según sea el caso, determinada comparando las secuencias. En la técnica, “identidad” significa también el grado de similitud de secuencia entre las secuencias polipeptídica o polinucleotídica, según sea el caso, determinada por la coincidencia entre cadenas de dichas secuencias. La “identidad” puede calcularse fácilmente mediante procedimientos conocidos, pero no limitados a los 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 se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Además, los procedimientos para determinar la identidad están codificados en programas informáticos disponibles públicamente. Los procedimientos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero sin limitación, el programa GAP en el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12 (1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN (Altschul, S.F. *et al.*, *J. Molec. Biol.* 215: 403-410 (1990) y FASTA (Pearson y Lipman *Proc. Natl. Acad.*

## ES 2 305 111 T3

*Sci. USA* 85; 2444-2448 (1988). La familia BLAST de programas está públicamente disponible en el NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990)). También puede usarse el bien conocido algoritmo de Smith Waterman para determinar la identidad.

5

Los parámetros para comparación de secuencia polipeptídica incluyen los siguientes:

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

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

Penalización de hueco: 8

15 Penalización de longitud de hueco: 2

Un programa útil con estos parámetros está públicamente disponible como el programa “gap” de Genetics Computer Group, Madison WI. Los parámetros anteriormente mencionados son los parámetros por defecto para comparaciones peptídicas (junto con ninguna penalización para huecos terminales).

20

Los parámetros para comparación de polinucleótidos incluyen los siguientes:

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

25 Matriz de comparación: coincidencias = +10, emparejamientos incorrectos = 0

Penalización de hueco: 50

Penalización de longitud de hueco: 3

30

Disponible como programa “gap” de Genetics Computer Group, Madison WI. Estos son los parámetros por defecto para comparaciones de ácido nucleico.

35

Se proporcionan significados preferidos para “identidad” para polinucleótidos y polipéptidos, según sea el caso, en (1) y (2) a continuación.

40

(1) Los polinucleótidos incluyen adicionalmente un polinucleótido aislado que comprende una secuencia polinucleotídica que tiene al menos un 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 ó 100% de identidad con la secuencia de referencia de SEC N° ID 1, en los que dicha secuencia polinucleotídica puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC N° ID 1 o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones nucleotídicas en comparación con la secuencia de referencia, en los que dichas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una deleción, sustitución, incluyendo transición y transversión, o inserción nucleotídica, y en los que dichas alteraciones pueden aparecer en las posiciones 5' ó 3' terminales de la secuencia nucleotídica de referencia o en cualquier lugar entre estas posiciones terminales, dispersadas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia, y en los que dicho número de alteraciones nucleotídicas se determina multiplicando el número total de nucleótidos de la SEC N° ID 1 por el entero que define la identidad porcentual dividido entre 100 y restando después ese producto al número total de nucleótidos en la SEC N° ID 1, o:

50

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

55

en la que  $n_n$  es el número de alteraciones nucleotídicas,  $x_n$  es el número total de nucleótidos en la SEC N° ID 1, y es 0,50 para 50%, 0,60 para 60%, 0,70 para 70%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85%, 0,90 para 90%, 0,95 para 95%, 0,97 para 97% ó 1,00 para 100%, y  $\cdot$  es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de  $x_n$  e  $y$  se redondea al entero más cercano menor antes de restarlo de  $x_n$ . Las alteraciones de las secuencias polinucleotídicas que codifican los polipéptidos de SEC N° ID 2 pueden crear mutaciones sin sentido, de sentido alterado o de desplazamiento de marco en estas secuencias de codificación y alterar así el polipéptido codificado por el polinucleótido después de dichas alteraciones. A modo de ejemplo, una secuencia polinucleotídica de la presente invención puede ser idéntica a las secuencias de referencia de la SEC N° ID 1, es decir, puede ser un 100% idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de ácido nucleico en comparación con la secuencia de referencia, de tal modo que la identidad de secuencia porcentual sea menor de 100% de identidad. Dichas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una deleción, sustitución incluyendo transición y transversión, o inserción de ácido nucleico, y en las que dichas alteraciones pueden aparecer en las posiciones 5' ó 3'-terminales de la secuencia polinucleotídica de referencia o en cualquier lugar entre estas posiciones terminales, dispersadas individualmente entre los ácidos nucleicos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia. El número de alteraciones de ácido nucleico para una identidad porcentual dada se

65

## ES 2 305 111 T3

determina multiplicando el número total de ácidos nucleicos en la SEC N° ID 1 por el entero que define la identidad porcentual dividido entre 100, y restando después ese producto del número total de ácidos nucleicos en la SEC N° ID 1; o:

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

en la que  $n_n$  es el número de alteraciones de ácido nucleico,  $x_n$  es el número total de ácidos nucleicos en la SEC N° ID 1, y es, por ejemplo, 0,70 para 70%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85% etc.,  $\cdot$  es el símbolo para el operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de  $x_n$  e  $y$  se redondea al entero más cercano menor antes de restarlo de  $x_n$ .

(2) Los polipéptidos incluyen adicionalmente un polipéptido aislado que comprende un polipéptido que tiene al menos una identidad de 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 ó 100% con la secuencia de referencia polipeptídica de la SEC N° ID 2, en los que dicha secuencia polipeptídica puede ser idéntica a la secuencia de referencia de SEC N° ID 2 o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones aminoácidas en comparación con la secuencia de referencia, en los que dichas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una deleción, sustitución incluyendo sustitución conservativa y no conservativa o inserción aminoácida, y en los que dichas alteraciones pueden aparecer en las posiciones amino- o carboxi-terminales de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier lugar entre estas posiciones terminales, dispersadas individualmente entre los aminoácidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia, y en los que dicho número de alteraciones aminoácidas se determina multiplicando el número total de aminoácidos en la SEC N° ID 2 por el entero que define la identidad porcentual dividido entre 100 y restando después ese producto de dicho número total de aminoácidos en la SEC N° ID 2, o:

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

en la que  $n_a$  es el número de alteraciones aminoácidas,  $x_a$  es el número total de aminoácidos en la SEC N° ID 2, y es 0,50 para 50%, 0,60 para 60%, 0,70 para 70%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85%, 0,90 para 90%, 0,95 para 95%, 0,97 para 97% ó 1,00 para 100%, e  $y \cdot$  es el símbolo para el operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de  $x_a$  e  $y$  se redondea al entero más cercano menor antes de restarlo de  $x_a$ .

A modo de ejemplo, una secuencia polipeptídica de la presente invención puede ser idéntica a la secuencia de referencia de la SEC N° ID 2, es decir puede ser 100% idéntica, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones aminoácidas en comparación con la secuencia de referencia, de tal modo que la identidad porcentual sea menor de 100% de identidad. Dichas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una deleción, sustitución incluyendo sustitución conservativa y no conservativa o inserción aminoácida, y en la que dichas alteraciones pueden aparecer en las posiciones amino- o carboxi-terminales de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, dispersadas individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia. El número de alteraciones aminoácidas para un % de identidad dado se determina multiplicando el número total de aminoácidos en la SEC ID N° 2 por el entero que define la identidad porcentual dividido entre 100 y restando después ese producto de dicho número total de aminoácidos en la SEC N° ID 2, o:

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

en la que  $n_a$  es el número de alteraciones aminoácidas,  $x_a$  es el número total de aminoácidos de la SEC N° ID 2, y es, por ejemplo, 0,70 para 70%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85% etc.,  $y \cdot$  es el símbolo para el operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de  $x_a$  e  $y$  se redondea al entero más cercano menor antes de restarlo de  $x_a$ .

“Individuo(s)”, cuando se usa en la presente memoria con referencia a un organismo, significa un eucariota multicelular incluyendo, pero sin limitación, 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, concretamente, si aparece en la naturaleza, se ha cambiado o retirado de su entorno natural, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido presente naturalmente en un organismo vivo no está “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes de su estado natural está “aislado”, según se emplea el término en la presente memoria. Además, un polinucleótido o polipéptido que se introduce en un organismo mediante transformación, manipulación genética o mediante cualquier otro procedimiento recombinante, está “aislado” incluso si sigue presente en dicho organismo, pudiendo estar dicho organismo vivo o muerto.

“Polinucleótido(s)” designa generalmente cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado, incluyendo regiones mono- y bicatenarias.

## ES 2 305 111 T3

“Variante” designa un polinucleótido o polipéptido que difiere de un polinucleótido o polipéptido de referencia pero retiene propiedades esenciales. Una variante típica de polinucleótido difiere en la secuencia nucleotídica de otro polinucleótido de referencia. Los cambios en la secuencia nucleotídica de la variante pueden alterar o no la secuencia aminoacídica de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Los cambios nucleotídicos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos aminoacídicos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se discute a continuación. Una variante típica de un polipéptido difiere en la secuencia aminoacídica de otro, el polipéptido de referencia y la variante son estrechamente similares en total y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia aminoacídica en una o más sustituciones, adiciones o deleciones en cualquier combinación. Un residuo aminoacídico sustituido o insertado puede estar o no codificado por el código genético. Una variante de un polinucleótido o polipéptido puede ser de origen natural, tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no es conocida por aparecer naturalmente. Las variantes de origen no natural de polinucleótidos y polipéptidos pueden prepararse mediante técnicas de mutagénesis o síntesis directa.

“Enfermedad(es)” significa cualquier enfermedad causada por o relacionada con infección por una bacteria incluyendo, por ejemplo, otitis media en lactantes y niños, neumonía en ancianos, sinusitis, infecciones intrahospitalarias y enfermedades invasivas, otitis media crónica con pérdida de audición, acumulación de fluido en el oído medio, lesión del nervio auditivo, aprendizaje retardado del habla, infección del tracto respiratorio superior e inflamación del oído medio.

### Ejemplos

Los ejemplos siguientes se llevan a cabo usando técnicas estándar que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, excepto cuando se describe con detalle de otro modo. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

#### Ejemplo 1

*Secuenciación de ADN del gen BASB205 de cepa 3224A de Haemophilus influenzae no tipable*

A: *BASB205 en cepa 3224A de Haemophilus influenzae no tipable*

Se muestra la secuencia de ADN del polinucleótido BASB205 de cepa 3224A de *Haemophilus Influenzae* no tipable (también designada cepa ATCC PT-1816) en la SEC N° ID 1. Se muestra la traducción de la secuencia polinucleotídica BASB205 en la SEC N° ID 2.

B: *BASB205 en cepa 3224A de Haemophilus influenzae no tipable*

Se confirmó la secuencia del polinucleótido BASB205 en cepa 3224A de *Haemophilus influenzae* no tipable. Con este fin, se sometió ADN plasmídico (véase el ejemplo 3A) que contenía la región génica que codificaba BASB205 de cepa 3224A de *Haemophilus influenzae* no tipable 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 suministrador, usando los cebadores NTNLP2 oli1 (5'-AC ATG TTG AAA AGA ATT TTA GTT AT -3') [SEC N° ID 14] y NTNLP2 oli2 (5'-AGA TCT CAT AAT ACG ACG CGA TTG AGT-3') [SEC N° ID 15] específicos del polinucleótido BASB205 y el cebador de secuencia universal M13 (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') [SEC N° ID 16] y el cebador de secuencia inversa M13 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') [SEC N° ID 17] específicos del vector. Como resultado, se obtuvieron las secuencias polinucleotídica y polipeptídica deducida, respectivamente. Usando el programa Clustalx 1.8, se alineó la secuencia polinucleotídica con la SEC N° ID 1, una comparación por pares de identidades mostró que la secuencia polinucleotídica era un 100% idéntica a la SEC N° ID 1 por toda su longitud. Usando el mismo programa Clustalx 1.8, se alineó la secuencia polipeptídica con la SEC N° ID 2, una comparación por pares de identidades mostró que la secuencia polipeptídica era un 100% idéntica a la SEC N° ID 2 por toda su longitud.

#### Ejemplo 2

*Análisis de variabilidad del gen BASB205 entre cepas de Haemophilus influenzae no tipables*

Se extrajo ADN genómico de 5 cepas de *Haemophilus influenzae* NT adicionales (presentadas en la Tabla 1) como sigue. Se inoculó un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenía ~100 ml de caldo BHI con el cultivo de siembra y se cultivó durante ~12-16 horas a 37°C en un incubador agitado, a ~175 rpm, generando una masa celular para el aislamiento de ADN. Se recogieron las células mediante centrifugación en un rotor Sorvall GSA a ~2000 X g durante 15 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante. Se extrajo el ADN genómico del sedimento de células *Haemophilus influenzae* NT usando el kit de extracción de ADN genómico QIAGEN (Qiagen GmbH). Se sometió 1 µg de este material a amplificación de ADN por reacción en cadena con polimerasa usando los cebadores MCM009 (5'- GAT AGC CGC

## ES 2 305 111 T3

5 TGC GAA ATT TTA-3') [SEC N° ID 18] y MCM010 (5'- CAA AAA AAC CGA ACT TAA TGT TCG-3') [SEC N° ID 19]. Se purificó este producto de PCR usando el kit High Pure PCR Product Purification (Roche), se sometió a secuenciación de ADN usando el kit Big Dyes (Applied Biosystems) y se analizó en un analizador genético ABI PRISM 310 mediante los cebadores MCM009 [SEC N° ID 18] y MCM010 [SEC N° ID 19] en las condiciones descritas por el  
 10 suministrador. Usando el programa Clustalx 1.8, se realizó un alineamiento de las secuencias polinucleotídicas, y se representa en la Figura 1. Una comparación por pares de identidades mostró que las secuencias polinucleotídicas SEC N° ID 3, 5, 7, 9 y 11 resultaron ser entre 99 y 100% idénticas a la SEC N° ID 1 (Tabla 2). Usando el programa Clustalx 1.8, se realizó un alineamiento de las secuencias polipeptídicas, y se representa en la Figura 2. Una comparación por pares de identidades mostró que las secuencias polipeptídicas SEC N° ID 4, 6, 8, 10 y 12 resultaron ser entre 98 y 100% idénticas a la SEC N° ID 2 (Tabla 3).

TABLA 1

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

Cepa	aislada en	de	Secuencia nucleotídica	Secuencia peptídica
3224A	EE.UU.	Otitis media	SEC N° ID 1	SEC N° ID 2
3219C	EE.UU.	Otitis media	SEC N° ID 3	SEC N° ID 4
901905U	Holanda	Fibrosis quística	SEC N° ID 5	SEC N° ID 6
772	Suecia	Exudado nasofaríngeo	SEC N° ID 7	SEC N° ID 8
289		Bronquitis crónica	SEC N° ID 9	SEC N° ID 10
A840177	Holanda	Cepa portadora	SEC N° ID 11	SEC N° ID 12

TABLA 2

*Comparación por pares de secuencias polinucleotídicas*

	SEC N° ID 1	SEC N° ID 3	SEC N° ID 5	SEC N° ID 7	SEC N° ID 9	SEC N° ID 11
SEC N° ID 1		99	99	99	99	99
SEC N° ID 3			100	100	99	100
SEC N° ID 5				100	99	100
SEC N° ID 7					99	100
SEC N° ID 9						99
SEC N° ID 11						

# ES 2 305 111 T3

TABLA 3

Comparación por pares de secuencias polipeptídicas

	SEC N°	SEC N°	SEC N°	SEC N°	SEC N°	SEC N°
	ID 2	ID 4	ID 6	ID 8	ID 10	ID 12
SEC N° ID 2		99	99	99	98	99
SEC N° ID 4			100	100	98	100
SEC N° ID 6				100	98	100
SEC N° ID 8					98	100
SEC N° ID 10						98
SEC N° ID 12						

### Ejemplo 3

#### Construcción de plásmido para expresar BASB205 recombinante

##### A: Clonación de BASB205

Los sitios de restricción *AflIII* y *BglIII* modificados por ingeniería genética en cebadores de amplificación NTNLP2 oli1 (5'-AC ATG TTG AAA AGA ATT TTA GTT AT -3') [SEC N° ID 14] de codificación y NTNLP2 oli2 (5'-AGA TCT CAT AAT ACG ACG CGA TTG AGT-3') [SEC N° ID 15] inverso, respectivamente, permitieron la clonación direccional del producto de PCR en el plásmido de expresión pQE60 de *E. coli* de tal modo que la proteína BASB205 pudiera expresarse en forma de una proteína de fusión que contiene un marcaje de cromatografía de afinidad (His)<sub>6</sub> en el extremo C. Se introdujo primero el producto PCR de BASB205 en el vector de clonación pCRII TOPO (Invitrogen) usando células bacterianas Top 10, según las instrucciones del fabricante. Se realizó este constructo intermedio para facilitar la clonación posterior en un vector de expresión. Se seleccionaron los transformantes que contenían el inserto de ADN de BASB205 mediante análisis de enzima de restricción. Después de la digestión, se analizó una alícuota de ~20 µl de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8% de agarosa en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE)). Se visualizaron los fragmentos de ADN mediante iluminación UV después de electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Se sometió a electroforesis un patrón de tamaño molecular de ADN (escala de 1 Kb, Life Technologies) en paralelo con las muestras de ensayo y se usó para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN. Se digirió después secuencialmente el plásmido purificado de transformantes seleccionados hasta terminación con enzimas de restricción *AflIII* y *BglIII* como recomendaba el fabricante (Life Technologies). Se purificó entonces el fragmento de ADN digerido usando columnas de centrifugado basadas en gel de sílice antes del ligamiento con el plásmido pQE60.

##### B: Producción de vector de expresión

Para preparar el plásmido de expresión pQE60 para ligamiento, se digirió de forma similar hasta terminación tanto con *NcoI* como con *BglIII*. Se usó un exceso molar de aproximadamente 5 veces de los fragmentos digeridos al vector preparado para programar la reacción de ligamiento. Se realizó una reacción de ligamiento estándar de ~20 µl (~16°C, ~16 horas), usando procedimientos bien conocidos en la técnica, usando ADN ligasa T4 (~2,0 unidades/reacción, Life Technologies). Se usó una alícuota del ligamiento (~5 µl) para transformar células electrocompetentes M15 (pREP4) según procedimientos bien conocidos en la técnica. Después de un periodo de crecimiento de ~2-3 horas a 37°C en ~1,0 ml de caldo LB, se sembraron las células transformadas en placas de agar LB que contenían ampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (30 µg/ml). Se incluyó antibiótico en la selección. Se incubaron las placas durante una noche a 37°C durante ~16 horas. Se escogieron colonias ApR/KanR individuales con palillos de dientes estériles y se usaron para inocular "siembras" en placas LB ApR/KanR recientes así como en ~1,0 ml de caldo de cultivo LB Ap/Kan. Tanto las placas con siembra como el caldo de cultivo se incubaron durante una noche a 37°C en un incubador

## ES 2 305 111 T3

estándar (placas) o un baño de agua agitado. Se empleó un análisis PCR basado en célula entera para verificar que los transformantes contenían el inserto de ADN. Se transfirió aquí el ~1,0 ml de caldo de cultivo LB Ap/Kan durante una noche a un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se recogieron las células mediante centrifugación en una microcentrífuga Beckmann (~3 min, temperatura ambiente, ~12.000 X g). Se suspendió el sedimento celular en ~200  $\mu$ l de agua estéril y se usó una alícuota de ~10  $\mu$ l para programar una reacción PCR de volumen final ~50  $\mu$ l que contenía tanto cebadores de amplificación de codificación como inversos de BASB205. Se aumentó la etapa de desnaturalización inicial a 95°C a 3 minutos para asegurar la ruptura térmica de las células bacterianas y la liberación del ADN plasmídico. Se usó un ciclador térmico ABI modelo 9700 y un perfil de amplificación térmica de 32 ciclos de tres etapas, concretamente, 95°C, 45 s; 55-58°C, 45 s, 72°C, 1 min, para amplificar el fragmento de BASB205 de las muestras transformantes lisadas. Después de la amplificación térmica, se analizó una alícuota de ~20  $\mu$ l de la reacción mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8% de agarosa en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE)). Se visualizaron los fragmentos de ADN mediante iluminación UV después de electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Se sometió a electroforesis un patrón de tamaño molecular de ADN (escala de 1 kb, Life Technologies) en paralelo con las muestras de ensayo y se usó para estimar el tamaño de los productos de PCR. Se identificaron los transformantes que producían el producto PCR del tamaño esperado como cepas que contenían un constructo de expresión de BASB205. Se analizaron entonces en las cepas que contenían plásmido de expresión la expresión inducible de BASB205 recombinante.

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

Se inoculó una alícuota de cultivo de siembra (~1,0 ml) durante una noche en un matraz Erlenmeyer que contenía ~25 ml de caldo LB Ap/Kan y se cultivó a 37°C con agitación (~250 rpm) hasta que la turbidez del cultivo alcanzó una  $DO_{600}$  de ~0,5, concretamente, fase semilogarítmica (habitualmente aproximadamente 1,5-2,0 horas). En este momento, se transfirió aproximadamente la mitad del cultivo (~12,5 ml) a un segundo matraz de 125 ml y se indujo la expresión de proteína BASB205 recombinante mediante la adición de IPTG (solución 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 continuó durante 4 horas adicionales a 37°C con agitación. Se retiraron muestras (durante una noche 1,0 ml) de ambos cultivos inducido y no inducido después del periodo de inducción y se recogieron las células mediante centrifugación en una microcentrífuga a temperatura ambiente durante ~3 minutos. Se suspendieron los sedimentos celulares individuales en ~50  $\mu$ l de agua estéril, se mezclaron entonces con un volumen igual de 2X tampón de muestra Laemmli PAGE-SDS que contenía 2-mercaptoetanol, y se dispusieron en un baño de agua hirviendo durante ~3 min para desnaturalizar la proteína. Se cargaron volúmenes iguales (~15  $\mu$ l) de ambos lisados celulares brutos inducido por IPTG y no inducido en gel de poliacrilamida con 12% de Tris/glicina por duplicado (minigeles de 1 mm de grosor, Novex). Se sometieron a electroforesis las muestras de lisado inducida y no inducida junto con los marcadores de peso molecular preteñidos (SeeBlue, Novex) en condiciones convencionales, usando un tampón de desplazamiento estándar de SDS/Tris/glicina (BioRad). Después de la electroforesis, se tiñó un gel con azul brillante de Coomassie R250 (BioRad) y destiñó entonces para visualizar la proteína BASB205 inducible por IPTG novedosa. Se sometió a electrotransferencia el segundo gel en una membrana de PVDF (tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m, Novex) durante ~2 horas a 4°C usando un aparato de transferencia BioRad Mini-Protean II y tampón de transferencia de metanol de Towbin (al 20%). Se realizaron el bloqueo de la membrana y las incubaciones de anticuerpo según procedimientos bien conocidos en la técnica. Se usó un anticuerpo monoclonal anti-RGS (His)<sub>3</sub>, seguido de un segundo anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con HRP (QiaGen), para confirmar la coexpresión e identidad de la proteína recombinante BASB205. Se consiguió la visualización del patrón reactivo de anticuerpo anti-His usando un sustrato insoluble ABT o usando Hyperfilm con el sistema de quimioluminiscencia Amersham ECL.

### Ejemplo 4

#### Producción de BASB205 recombinante

##### Cepa bacteriana

Se usó una cepa de expresión recombinante de M15 (pREP4) de *E. coli* que contenía un plásmido (pQE60) que codificaba BASB205 de *Haemophilus influenzae* NT para producir una masa celular para la purificación de proteína recombinante. Se cultivó la cepa de expresión en placas de agar LB que contenían 100  $\mu$ g/ml de ampicilina (“Ap”) y 30  $\mu$ g/ml de kanamicina (“Km”) para asegurar que se mantenían pQE60 y pREP4. Para crioconservación a -80°C, se propagó la cepa en caldo LB que contenía la misma concentración de antibióticos y se mezcló entonces con un volumen igual de caldo LB que contenía un 30% (p/v) de glicerina.

##### Medios

El medio de crecimiento usado para la producción de proteína recombinante consistía en caldo LB (Difco) que contenía Ap 100  $\mu$ g/ml y Km 30  $\mu$ g/ml. Para inducir la expresión de la proteína recombinante BASB205, se añadió IPTG ( $\beta$ -D-tiogalactopiranosido de isopropilo) al cultivo (1 mM, final).

##### Fermentación

Se inoculó un matraz Erlenmeyer de siembra de 100 ml, que contenía 10 ml de volumen de trabajo, con 0,3 ml de cultivo descongelado rápidamente o varias colonias de un cultivo de placa de agar selectivo, y se incubó durante

## ES 2 305 111 T3

aproximadamente 12 horas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en una plataforma agitada a 150 rpm (Innova 2100, New Brunswick Scientific). Se usó entonces este cultivo de siembra para inocular un Erlenmeyer de 500 ml de volumen de trabajo que contenía caldo LB y ambos antibióticos Ap y Km. Se añadió IPTG (solución madre 1,0 M, preparada en agua estéril) al Erlenmeyer cuando el cultivo alcanzó el crecimiento semilogarítmico ( $\sim 0,5$  de unidades de  $\text{DO}_{600}$ ). Se indujeron las células durante 4 horas y después se recogieron usando una centrífuga 28RS Heraeus (Sepatech) o RC5C Superspeed (Sorvall Instruments). Se almacenó la pasta celular a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el procesamiento.

### *Productos químicos y materiales*

Se adquirieron imidazol y Triton X-100 en Merck. El clorhidrato de guanidina era de Fluka. Se obtuvo la apronitina de Sigma Chemical Company. La urea y AEBSF eran de ICN-Biochemicals. Todos los demás productos químicos eran de pureza de reactivo o mejor. La resina Ni-NTA Superflow y anticuerpo Penta-His exento de BSA se obtuvieron de QiaGen. El ensayo MicroBCA se obtuvo de Pierce; los filtros Amicon 3 de Millipore. La membrana de diálisis (MWCO12-14000) era de MFPI, EE.UU. El marcador de masa molecular (escala BenchMark) era de Life Technologies.

### Ejemplo 5

*Expresión y purificación de proteína BASB205 recombinante en Escherichia coli*

#### *Extracción-purificación*

Se resuspendió pasta celular de 1.750 ml de cultivo inducido con IPTG ( $\sim 4$  horas,  $\text{DO}_{620} = 0,5$ ) en 140 ml de tampón fosfato a pH 7,5 que contenía AEBSF 1 mM y aprotinina 1 mM como inhibidores de proteasa. Se lisaron las células en un disruptor celular. Se centrifugó el lisado a 27.000 g durante 20 minutos. Se lavó el sedimento una vez con tampón fosfato a pH 7,5 y se centrifugó de nuevo a 27.000 g durante 20 minutos. Se suspendió el sedimento en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, tampón Tris-HCl 10 mM a pH 8 que contenía cloruro de guanidinio 6 M (tampón A) y se dejó durante 1 h a temperatura ambiente. Se centrifugó el extracto total a 27.000 g durante 20 minutos. Se incubó el sobrenadante durante 1 hora a temperatura ambiente con resina Ni-NTA Superflow equilibrada en tampón A. Se lavó la resina dos veces con  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, tampón Tris-HCl 10 mM a pH 6,3, que contenía urea 8M (tampón B). Se realizó la elución sucesivamente con tampón B ajustado a pH 5,9, después a pH 4,5. Se neutralizaron las fracciones que contenían proteína BASB205 con 25% en volumen de tampón fosfato 0,2 M a pH 7,5. Se dializaron sucesivamente las fracciones reunidas frente a  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM que contenía urea 8 M, después urea 4 M, después urea 2 M y finalmente frente a PBS a pH 7,4 que contenía 0,1% de Triton X-100. Apareció algo de precipitación en la última etapa de diálisis. Se cuantificó la proteína BASB205 purificada usando reactivo de ensayo Micro BCA. Se obtuvieron 1,9 mg de antígeno purificado, a una concentración final de  $150 \mu\text{g/ml}$ . Como se muestra en la Figura 3-A, apareció proteína BASB205 purificada en el análisis de PAGE-SDS en forma de una banda mayoritaria que migra aproximadamente a 20 kDa (masa molecular relativa estimada). Se estimó la pureza en un 90%. La proteína BASB205 era reactiva frente a un anticuerpo monoclonal de ratón originado contra el motivo 6-histidina (Figura 3-B).

### Ejemplo 6

*Producción de antisueros de BASB205 recombinante*

Se generan antisueros polivalentes dirigidos contra la proteína BASB205 vacunando conejos con la proteína BASB205 recombinante purificada. Los antisueros polivalentes dirigidos contra la proteína BASB205 se generan también vacunando ratones con proteína BASB205 recombinante purificada. Se extrae sangre a los animales antes de la primera inmunización ("preextracción") y después de la última inmunización.

Se miden los títulos de proteína anti-BASB205 mediante ELISA usando proteína BASB205 recombinante purificada como antígeno de recubrimiento. El título se define como los títulos de punto medio calculados mediante un modelo logístico de 4 parámetros usando el software XL Fit. Se usan también los antisueros como primer anticuerpo para identificar la proteína en una transferencia Western como se describe en el ejemplo 8 siguiente.

### Ejemplo 7

*Caracterización inmunológica: exposición a superficie de BASB205*

Se generó suero anti-BASB205 mediante inmunización subcutánea de 18 ratones BALB/c (hembra, de 6 semanas de edad) con  $100 \mu\text{l}$  de vacuna correspondientes a una dosis de  $10 \mu\text{g}$ , y se revacunaron 2 semanas después. Se determinaron los títulos de proteína anti-BASB205 mediante ELISA usando células enteras matadas con formalina de cepas NTHi 3224A ( $20 \mu\text{g/pocillo}$ ). Se define el título como los títulos de punto medio calculados mediante un modelo logístico de 4 parámetros usando el software SoftMax Pro. Los títulos observados con el suero inmune de ratones eran 19 veces mayores que el suero preinmune correspondiente y demuestran que la proteína BASB205 se detecta en la superficie de células NTHi.

## ES 2 305 111 T3

### Ejemplo 8

#### *Caracterización inmunológica: análisis de transferencia Western*

5 Se cultivan varias cepas de NTHi, así como aislamientos clínicos, en placas de agar achocolatado durante 24 horas a 36°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se usan varias colonias para inocular caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) suplementado con NAD y hemina, cada uno a 10 µg/ml. Se cultivan los cultivos hasta que la absorbancia a 620 nm es de aproximadamente 0,4 y se recogen las células mediante centrifugación. Se concentran entonces las células y se solubilizan en tampón de muestra PAGE. Se resuelven entonces las células solubilizadas en geles de poliacrilamida al 4-20% y se  
10 transfieren electroforéticamente las proteínas separadas a membranas de PVDF. Se pretratan entonces las membranas de PVDF con tampón de saturación. Se llevan a cabo todas las incubaciones posteriores usando este tampón de pretratamiento. Se incuban las membranas de PVDF con suero preinmune o suero inmune de conejo o ratón. Se lavan entonces las membranas de PVDF. Se incuban las membranas de PVDF con Ig de oveja anti-conejo o ratón marcado con biotina. Se lavan entonces las membranas de PVDF 3 veces con tampón de lavado, y se incuban con estreptavidina-peroxidasa. Se lavan entonces las membranas de PVDF 3 veces con tampón de lavado y se revelan con 4-cloro-1-naftol.

### Ejemplo 9

#### *Caracterización inmunológica: actividad bactericida*

20 Se examina la actividad citotóxica mediada por complemento de anticuerpos anti-BASB205 para determinar el potencial de vacuna de antisuero de proteína BASB205 que se prepara como se describe anteriormente. Se examinan las actividades del suero preinmune y el suero anti-BASB205 en la mediación de la eliminación por complemento de NTHi.

25 Se cultivan cepas de NTHi en placas. Se añaden varias colonias al medio líquido. Se cultivan los cultivos y se recogen hasta que la A620 es de aproximadamente 0,4. Después de una etapa de lavado, se suspende el sedimento y se diluye.

30 Se depositan los sueros preinmunes y los sueros anti-BASB205 en el primer pocillo de una placa de 96 pocillos y se depositan diluciones en serie en los demás pocillos de la misma línea. Se añade posteriormente NTHi viva diluida y se incuba la mezcla. Se añade complemento a cada pocillo a una dilución de trabajo definida previamente en un ensayo de toxicidad.

35 Cada ensayo incluye un control de complemento (pocillos sin suero que contiene una fuente de complemento activo o inactivado), un control positivo (pocillos que contienen suero con un título conocido de anticuerpos bactericidas), un cultivo de control (pocillos sin suero ni complemento) y un control de suero (pocillos sin complemento).

40 Se mide la actividad bactericida de antisuero de conejo o ratón (50% de eliminación de la cepa homóloga).

### Ejemplo 10

#### *Presencia de anticuerpo de BASB205 en sueros de seres humanos convalecientes*

45 Se realiza el análisis de transferencia Western de BASB205 recombinante purificada como se describe en el ejemplo 5 anterior, excepto porque se usa un conjunto de sueros humanos de niños infectados por NTHi como primera preparación de anticuerpo.

### Ejemplo 11

#### *Eficacia de la vacuna de BASB205: potenciamiento de la depuración pulmonar de NTHi en ratones*

55 Este modelo de ratón está basado en el análisis de la invasión pulmonar de ratones vacunados por NTHi después de una exposición a la infección intranasal estándar. Se inmunizan por vía subcutánea grupos de 6 ratones BALB/c (hembras, 6 semanas de edad) con 100 µl de vacuna correspondientes a una dosis de 10 µg y se revacunan 2 semanas después. Una semana después de la revacunación, se exponen los ratones a infección mediante la instilación de 50 µl de suspensión bacteriana (5 x 10<sup>5</sup> UFC/50 µl) en el orificio nasal izquierdo con anestesia (los ratones se anestesian con una combinación de anestésicos ketamina y xilacina, 0,24 mg de xilacina (Rompun) y 0,8 mg de ketamina (Imalgene)/100 µl). Se sacrifican los ratones a las 0,5, 6 y 24 horas después de la exposición a la infección, se retiran asépticamente los pulmones y se homogeneizan individualmente. Se determina el logaritmo decimal del número medio ponderado de UFC/pulmón contando las colonias crecidas en placas de agar GC después de sembrar 20 µl de 5 diluciones en serie del homogeneizado. Se calculan para cada grupo la media aritmética del logaritmo decimal del número medio ponderado de UFC/pulmón y los errores estándar. Se analizan estadísticamente los resultados aplicando un ANOVA de 1 vía después de suponer la igualdad de la varianza (comprobado por el ensayo de Brown y Forsythe) y la normalidad (comprobado usando el ensayo de Shapiro-Wilk). Se analizan las diferencias entre grupos usando el ensayo de rango ajustado a Student de Tukey (HSD). En este experimento, se inmunizaron grupos de ratones con BASB205 adsorbido

## ES 2 305 111 T3

sobre  $\text{AlPO}_4$  (10  $\mu\text{g}$  de BASB205 sobre 100  $\mu\text{g}$  de  $\text{AlPO}_4$ ) o con una preparación de células enteras muertas (kwc) de NTHi cepa 3224A adsorbida sobre  $\text{AlPO}_4$  ( $5 \times 10^8$  células sobre 100  $\mu\text{g}$  de  $\text{AlPO}_4$ ) o con 100  $\mu\text{g}$  de  $\text{AlPO}_4$  sin antígeno. Se expusieron a infección los ratones con  $5 \times 10^5$  UFC de bacterias NTHi de cepa 3224A vivas.

5 Se calcularon el logaritmo decimal del número medio ponderado de UFC/pulmón y los errores estándar para cada grupo a las 0,5, 6 y 24 horas después de la exposición a la infección. Los ratones inmunizados ficticiamente tenían 6,31 (+/- 0,13) y 3,96 (+/- 0,20) de  $\log_{10}$  de UFC/pulmones a las 6 y 24 horas después de la exposición a la infección, respectivamente. La preparación de kwc indujo una depuración pulmonar significativa en comparación con el grupo de control a las 6 horas (0,81 de diferencia logarítmica,  $p=0,0000$ ) y 24 horas (1,18 de diferencia logarítmica,  $p=0,0000$ )  
 10 después de la exposición la infección. La vacuna de BASB205 indujo un  $\log$  0,56 (+/- 0,24,  $p=0,0001$ ) y un  $\log$  1,22 (+/- 0,32,  $p=0,0000$ ) de diferencia significativa en la depuración pulmonar en comparación con el grupo de control a las 6 y 24 horas después de la exposición a la infección, respectivamente.

### 15 Ejemplo 12

#### *Inhibición de la adhesión de NTHi a células por antisuero anti-BASB205*

20 Este ensayo mide la capacidad de sueros anti-BASB205 de inhibir la adhesión de bacterias NTHi a células epiteliales. Esta actividad podría evitar la colonización de la nasofaringe por NTHi. Se incubó un volumen de bacterias en hielo con un volumen de dilución de suero preinmune o inmune anti-BASB205. Se añade posteriormente esta mezcla a los pocillos de una placa de 24 pocillos que contiene un cultivo de células confluentes que se lava una vez con medio de cultivo para retirar las trazas de antibiótico. Se centrifuga la placa y se incubó. Se lava entonces suavemente cada pocillo. Después del último lavado, se añade glicocolato de sodio a los pocillos. Después de la incubación, se rasca  
 25 la capa celular y se homogeneiza. Se siembran las diluciones del homogeneizado en placas de agar y se incuban. Se cuenta el número de colonias en cada placa y se calcula el número de bacterias presentes en cada pocillo.

### Ejemplo 13

#### 30 *Epítotos útiles*

Los epítotos de linfocitos B de una proteína están localizados principalmente en su superficie. Para predecir los epítotos de linfocitos B de un polipéptido BASB205, 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, Uxbridge UB8 3PH, UK) (Fig. 4). Se calculó el índice antigénico basándose en el procedimiento descrito por Jameson y Wolf (CABIOS 4: 181-186 [1988]). Los parámetros antigénicos usados en este programa son el índice antigénico y la longitud mínima para un péptido antigénico. Se usó un índice antigénico de 0,9 para un mínimo de 5 aminoácidos consecutivos como umbral en el programa. Se enumeran en la Tabla 4 los péptidos que comprenden buenos epítotos  
 40 de linfocitos B potenciales. Estos pueden ser útiles (preferiblemente conjugados o unidos recombinantemente a una proteína mayor) en una composición de vacuna para la prevención de infecciones por NTHi, así como péptidos similares que comprenden mutaciones conservativas (preferiblemente 70, 80, 95, 99 ó 100% idénticos a las secuencias de la Tabla 4) o truncamientos que comprenden 5 o más (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó 15) aminoácidos de los mismos o extensiones que comprenden, por ejemplo, 1, 2, 3, 5, 10 aminoácidos adicionales en cualquiera o ambos  
 45 extremos del contexto nativo del polipéptido BASB205 que conservan un epítoto eficaz que puede desencadenar una respuesta inmunitaria en un hospedador contra el polipéptido BASB205.

TABLA 4

*Epítotos de linfocitos B potenciales de la SEC N° ID 2*

50

Posición	Secuencia
19	SNAPRTV
55 31	SEND DI
45	LEKDNRTG
60 57	VRTNRS
77	EWVGTRYRMGGTTKRGID
112	PRSTAEQRHLGRKINKSELKK
65 139	RKNNHV
167	LDEKYWARTYTQSRRIM

## ES 2 305 111 T3

Los epítomos de linfocitos T auxiliares son péptidos unidos a moléculas HLA de clase II y reconocidos por linfocitos T auxiliares. La predicción de los epítomos de linfocitos T auxiliares útiles de un polipéptido BASB205 se basó en el procedimiento TEPITOPE descrito por Sturniolo *et al.* (*Nature Biotech.* 17: S55-561 [1999]). Se enumeran en la Tabla 5 los péptidos que comprenden buenos epítomos de linfocitos T potenciales. Estos pueden ser útiles (preferiblemente conjugados con péptidos, polipéptidos o polisacáridos) con fines de vacuna, así como péptidos similares que comprenden mutaciones conservativas (preferiblemente 70, 80, 95, 99 ó 100% idénticos a las secuencias siguientes) o truncamientos que comprenden 5 o más (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18 ó 20) aminoácidos de los mismos o extensiones que comprenden, por ejemplo, 1, 2, 3, 5, 10 aminoácidos adicionales en cualquiera o ambos extremos del contexto nativo del polipéptido BASB205 que conservan un epítomo de linfocitos T auxiliares eficaz del polipéptido BASB205.

TABLA 5

*Epítomos de linfocitos T auxiliares potenciales de la SEC N° ID 2*

Posición	Secuencia
2	LKRILVIIGLAVLATACS
38	LTGLINNLEKDNRTGIFHKVVRTNRSSALMGDKALAS
78	WVGTRYRMGGTTKR
99	MQTTFSEVFGIELPRST
121	LGRKINKSE
135	LVFFRKNNHVGVIYIGNNQFM
172	WARTYTQSR

Todas las regiones identificadas que contienen epítomos como se definen anteriormente son con respecto a la SEC N° ID 2. Son también péptidos preferidos de la invención las correspondientes regiones en las SEC N° ID 4, 6, 8, 10, 12, como se definen por la posición en la tabla 4 y 5 con respecto a la SEC N° ID 2, y por su correspondiente péptido en el alineamiento de la Figura 2 para las SEC N° ID 4, 6, 8, 10, 12, como se describen en este ejemplo.

### *Materiales depositados*

Se ha depositado un depósito de la cepa 3 (cepa 3224A) en la American Type Culture Collection (ATCC) el 5 de mayo de 2000 y se le ha asignado el número de depósito PTA-1816.

El depósito de cepa de *Haemophilus influenzae* no tipable se designa en la presente memoria como "la cepa depositada" o como "el ADN de la cepa depositada".

La cepa depositada contiene un gen BASB205 completo.

La secuencia de polinucleótidos contenida en la cepa depositada, así como la secuencia aminoacídica de cualquier polipéptido codificado por la misma, son predominantes en el caso de cualquier conflicto con cualquier descripción de las secuencias de la presente memoria.

El depósito de la cepa depositada se ha realizado según los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes. La cepa depositada se liberará irrevocablemente y sin restricción ni condición al público tras la expedición de una patente. La cepa depositada se proporciona meramente por conveniencia para los expertos en la técnica y no es una admisión de que sea necesario un depósito para autorización, tal como el necesario según la 35 U.S.C. § 112. Puede ser necesaria una licencia para preparar, usar o vender la cepa depositada y compuestos derivados de la misma, y no se concede dicha licencia por la presente.

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario BM45422	Solicitud internacional N°
---	----------------------------

**INDICACIONES RELATIVAS AL DEPÓSITO DE UN MICROORGANISMO**

(Regla 13bis del PCT)

A. Los datos indicados más abajo se refieren al microorganismo mencionado en la página 76 líneas 1-22 de la descripción	
B. <b>IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO</b> Se identifican otros depósitos en una hoja adicional <input type="checkbox"/>	
Nombre de la institución de depósito AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION	
Dirección de la institución de depósito ( <i>incluidos código postal y país</i> ) 10801 UNIVERSITY BLVD, MANASSAS, VIRGINIA 20110-2209, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	
Fecha de depósito: 5 de mayo de 2000   N° de acceso: PTA-1816	
C. <b>INDICACIONES ADICIONALES</b> (sólo en caso necesario) Esta información continua en una hoja adicional <input type="checkbox"/>	
Con respecto a aquellas designaciones en que se busca una patente europea, se pondrá a disposición una muestra de los microorganismos depositados hasta la publicación de la mención de la concesión de la patente europea, o hasta la fecha en que se haya denegado o retirado la solicitud, sólo mediante la expedición de una muestra a un experto nombrado por la persona que solicita la muestra	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE FACILITAN LAS INDICACIONES (caso de que las indicaciones no se faciliten para todos los Estados designados)	
E. <b>INDICACIONES SUMINISTRADAS POR SEPARADO</b> ( <i>Sólo en caso necesario</i> )	
Las indicaciones enumeradas a continuación se suministrarán con posterioridad a la Oficina Internacional ( <i>especificar la naturaleza de las indicaciones, por ejemplo "n° de acceso del depósito"</i> )	
Reservado a la Oficina receptora	Reservado a la Oficina Internacional
+ Esta hoja se recibió junto con la solicitud internacional	<input type="checkbox"/> Esta hoja se ha recibido en la Oficina Internacional el
Funcionario autorizado  M. DAVIDSON	Funcionario autorizado

## ES 2 305 111 T3

### Información de secuencias

#### Secuencias de polinucleótido y polipéptido BASB205

5 SEC N° ID 1 secuencia polinucleotídica BASB205

10 ATGTTGAAAAGAATTTTAGTTATTATTGGTTTAGCTGTATTAGCAACCGCTTGTTCTAAT  
GCACCACGAACGGTAAGTCATCAGGTTATTTAGAAAATGATGATATTCATTAAGTGGT  
TTAATTAATAATTTAGAAAAAGATAATCGAACAGGCATTTTTCACAAAGTGAGAACAAAC  
CGTTCCTCTGCTTTGATGGGCGATAAGGCTCTAGCCAGTGTTTATAATGAATGGGTTGGC  
15 ACTCGCTATCGTATgggCGGTACGACTAAACGTGGTATTGATTGTTTACGACTTTATGCAA  
ACTACTTTTTCTGAAGTTTTTGGTATTGAATTGCCTCGTTCACGGCTGAACAGCGTCAT  
TTAGGTAGAAAAATTAATAAATCAGAACTTAAAAAAGGCGATTTAGTTTTCTCCGTAAA  
AATAATCACGTTGGTGTTTATATTGGTAATAACCAATTTATGCACGCAAGTACAGGGCAA  
20 GCGGTGACAATAAGTTCCCTTGATGAAAAATATTGGGCTAGAACCTTACTCAATCGCGT  
CGTATTATGTAA

25 SEC N° ID 2: secuencia polipeptídica BASB205

30 MLKRILVIIGLAVLATAACSNAPRTVSHQVISENDDIQLTGLINNLEKDNRTGIFHKVVRTN  
RSSALMGDKALASVYNEWVGTRYRMGGTTKRGIDCSAFMQTTFSEVFGIELPRSTAEQRH  
LGRKINKSELKKGDLVFFRKNNHVGVIIGNNQFMHASTGQGVTISSLDEKYWARTYTQSR  
RIM.

35 SEC N° ID 3: secuencia polinucleotídica BASB205

40 ATGTTGAAAAGAATTTTAGTTATTATTGGTTTAGCTGTATTAGCAACCGCTTGTTCTAAT  
GCACCACGAACGGTAAGTCATCAGGTTATTTAGAAAATGATGATATTCATTAAGTGGT  
TTAATTAATAATTTAGAAAAAGATAATCGAACAGGCATTTTTCACAAAGTGAGAACAAAC  
45 CGTTCCTCTGCTTTGATGGGCAATAAGGCTCTAGCCAGTGTTTATAATGAATGGGTTGGC  
ACTCGCTATCGTATGGGCGGTACGACTAAACGTGGTATTGATTGTTTACGACTTTATGCAA  
ACTACTTTTTCTGAAGTTTTTGGTATTGAATTGCCTCGTTCACGGCTGAACAGCGTCAT  
TTAGGTAGAAAAATTAATAAATCAGAACTTAAAAAAGGCGATTTAGTTTTCTCCGTAAA  
AATAATCACGTTGGTGTTTATATTGGTAATAACCAATTTATGCACGCAAGTACAGGGCAA  
50 GCGGTGACAATAAGTTCCCTTGATGAAAAATATTGGGCTAGAACCTTACTCAATCGCGT  
CGTATTATGTAA

55 SEC N° ID 4: secuencia polipeptídica BASB205

60 MLKRILVIIGLAVLATAACSNAPRTVSHQVISENDDIQLTGLINNLEKDNRTGIFHKVVRTN  
RSSALMGDKALASVYNEWVGTRYRMGGTTKRGIDCSAFMQTTFSEVFGIELPRSTAEQRH  
LGRKINKSELKKGDLVFFRKNNHVGVIIGNNQFMHASTGQGVTISSLDEKYWARTYTQSR  
RIM.

65

## ES 2 305 111 T3

SEC N° ID 5: secuencia polinucleotídica BASB205

5 ATGTTGAAAAGAATTTTAGTTATTATTGGTTTAGCTGTATTAGCAACCGCTTGTTCTAAT  
GCACCACGAACGGTAAGTCATCAGGTTATTTAGAAAATGATGATATTCAATTAAGTGGT  
TTAATTAATAATTTAGAAAAAGATAATCGAACAGGCATTTTTCACAAAGTGAGAACAAC  
10 CGTTCCTCTGCTTTGATGGGCAATAAGGCTCTAGCCAGTGTATAATGAATGGGTTGGC  
ACTCGCTATCGTATGGGCGGTACGACTAAACGTGGTATTGATTGTTTCAGCATTATGCAA  
ACTACTTTTTCTGAAGTTTTTGGTATTGAATTGCCTCGTTCACGGCTGAACAGCGTCAT  
TTAGGTAGAAAAATTAATAAATCAGAACTTAAAAAAGGCGATTTAGTTTTCTCCGTAAA  
15 AATAATCACGTTGGTGTATTATATTGGTAATAACCAATTTATGCACGCAAGTACAGGGCAA  
GGCGTGACAATAAGTTCCTTGATGAAAAATATTGGGCTAGAACCTACACTCAATCGCGT  
CGTATTATGTAA

20 SEC N° ID 6: secuencia polipeptídica BASB205

25 MLKRILVIIGLAVLATAACSNAPRTVSHQVISENDDIQLTGLINNLEKDNRTGIFHKVRTN  
RSSALMGNKALASVYNEWVGTRYRMGGTTKRGIDCSAFMQTTFSEVFGIELPRSTAEQRH  
30 LGRKINKSELKKGDLVFFRKNNHVGVYIGNNQFMHASTGQGVTISSLDEKYWARTYTQSR  
RIM.

35 SEC N° ID 7: secuencia polinucleotídica BASB205

40 ATGTTGAAAAGAATTTTAGTTATTATTGGTTTAGCTGTATTAGCAACCGCTTGTTCTAAT  
GCACCACGAACGGTAAGTCATCAGGTTATTTAGAAAATGATGATATTCAATTAAGTGGT  
TTAATTAATAATTTAGAAAAAGATAATCGAACAGGCATTTTTCACAAAGTGAGAACAAC  
CGTTCCTCTGCTTTGATGGGCAATAAGGCTCTAGCCAGTGTATAATGAATGGGTTGGC  
45 ACTCGCTATCGTATGGGCGGTACGACTAAACGTGGTATTGATTGTTTCAGCATTATGCAA  
ACTACTTTTTCTGAAGTTTTTGGTATTGAATTGCCTCGTTCACGGCTGAACAGCGTCAT  
TTAGGTAGAAAAATTAATAAATCAGAACTTAAAAAAGGCGATTTAGTTTTCTCCGTAAA  
AATAATCACGTTGGTGTATTATATTGGTAATAACCAATTTATGCACGCAAGTACAGGGCAA  
50 GGCGTGACAATAAGTTCCTTGATGAAAAATATTGGGCTAGAACCTACACTCAATCGCGT  
CGTATTATGTAA

55 SEC N° ID 8: secuencia polipeptídica BASB205

60 MLKRILVIIGLAVLATAACSNAPRTVSHQVISENDDIQLTGLINNLEKDNRTGIFHKVRTN  
RSSALMGNKALASVYNEWVGTRYRMGGTTKRGIDCSAFMQTTFSEVFGIELPRSTAEQRH  
LGRKINKSELKKGDLVFFRKNNHVGVYIGNNQFMHASTGQGVTISSLDEKYWARTYTQSR  
RIM.

65

## ES 2 305 111 T3

SEC N° ID 9: secuencia polinucleotídica BASB205

5 ATGTTGAAAAGAATTTTAGTTATTGTTGGTTTAACTGTATTAGCAACCGCTTGTTCTAAT  
GCACCACGAACGGTAAGTCATCAGGTTATTTTCAGAAAATGATGATATTCAATTAAGTGGT  
TTAATTAATAATTTAGAAAAAGATAATCGAACAGGCATTTTTCACAAAGTGAGAACAAC  
10 CGTTCCTCTGCTTTGATGGGCGATAAGGCTCTAGCCAGTGTTTATAATGAATGGGTGGT  
ACTCGCTATCGTATGGGCGGTACGACTAAACGTGGTATTGATTGTTTCAGCATTATGCAA  
ACAACCTTTTTCTGAAGTTTTTGGTATTGAATTGCCTCGTTCACGGCTGAACAGCGTCAT  
TTAGGTAGAAAAATTAATAAATCAGAACTTAAAAAAGGCGATTTAGTTTTCTCCGTAAA  
15 AATAATCACGTTGGTGTTTATATTGGTAATAACCAATTTATGCACGCAAGTACAGGGCAA  
GGCGTGACAATAAGTTCCCTTGATGAAAAATATTGGGCTAGAACCTACTCAatCGCGT  
CGTATTATGTAA

20 SEC N° ID 10: secuencia polipeptídica BASB205

25 MLKRILVIVGLTVLATAACSNAPRTVSHQVISENDDIQLTGLINNLEKDNRTGIFHKVRTN  
RSSALMGDKALASVYNEWVGTRYRMGGTTKRGIDCSAFMQTTFSEVFGIELPRSTAEQRH  
LGRKINKSELKKGDLVFFRKNNHVGVIIGNNQFMHASTGQGVTISSLDEKYWARTYTQSR  
RIM.

30 SEC N° ID 11: secuencia polinucleotídica BASB205

35 ATGTTGAAAAGAATTTTAGTTATTATTGGTTTAGCTGTATTAGCAACCGCTTGTTCTAAT  
GCACCACGAACGGTAAGTCATCAGGTTATTTTCAGAAAATGATGATATTCAATTAAGTGGT  
40 TTAATTAATAATTTAGAAAAAGATAATCGAACAGGCATTTTTCACAAAGTGAGAACAAC  
CGTTCCTCTGCTTTGATGGGCAATAAGGCTCTAGCCAGTGTTTATAATGAATGGGTGGC  
ACTCGCTATCGTATGGGCGGTACGACTAAACGTGGTATTGATTGTTTCAGCATTATGCAA  
ACTACTTTTTCTGAAGTTTTTGGTATTGAATTGCCTCGTTCACGGCTGAACAGCGTCAT  
TTAGGTAGAAAAATTAATAAATCAGAACTTAAAAAAGGCGATTTAGTTTTCTCCGTAAA  
45 AATAATCACGTTGGTGTTTATATTGGTAATAACCAATTTATGCACGCAAGTACAGGGCAA  
GGCGTGACAATAAGTTCCCTTGATGAAAAATATTGGGCTAGAACCTACTCAATCGCGT  
CGTATTATGTAA

50 SEC N° ID 12: secuencia polipeptídica BASB205

55 MLKRILVIIGLAVLATAACSNAPRTVSHQVISENDDIQLTGLINNLEKDNRTGIFHKVRTN  
RSSALMGKALASVYNEWVGTRYRMGGTTKRGIDCSAFMQTTFSEVFGIELPRSTAEQRH  
60 LGRKINKSELKKGDLVFFRKNNHVGVIIGNNQFMHASTGQGVTISSLDEKYWARTYTQSR  
RIM.

65

## ES 2 305 111 T3

SEC N° ID 13: secuencia polinucleotídica cadena arriba del codón de iniciación del polinucleótido BASB205

5           ATTTCTGTGTTAGTAGAGGAAAATGGAAAACGTGAACGAGGAAGTTGTGGTCTGGTGGG  
CGTTTCGGTTTAGATTGGTTCTTTGAAGTTGTTGATGGCGATATTAGAGCAGTACTTTTT  
GCTAAAGAAGCGGTTTCGTCAAGCCTTAGTAAACCTTAGTGCAGTTGCAGCACCCGCAGGA  
10           TTGATGCCTGTTGTGTTAGGTGCGGGTGGCCGGGCGTATTGCTACACGAAGCGGTAGGT  
CACGGTTTAGAAGGCGATTTAACCGTAAAGAAAGTTCACTTTTTACAGGCAAGATTGGT  
GAGCAAGTGACTTCACCGTTATGTACGATTGTGGATGATGGCACGATTGAAAATCGTCGA  
GGTTCACTAACTATTGATGATGAAGGTGTGCCAAGCCAGTGCAATGTACTCATCAAAGAC  
GGGATTTTGCAAGGTTACATGCAAGATAAAATGAATGCCCGTTGATGGGCGTTGCTCCA  
15           ACGGGAAATGGACGACGTGAGTCTTATGCCCATTTACCAATGCCTAGAATGACTAACACC  
TATATGCTTGCTGGACAAAGTCAGTTTGATGATTTGATTGCTTCTGTAAAACAGGGGATT  
TATGCACCGCACTTTGGTGGAGGGCAAGTGGATATTACCTCTGGTAAATTTGTATTTCT  
ACTTCAGAAGCCTATTTAATTGAAAAAGGAAAAATCACGAAACCAGTTAAGGGCGCAACT  
20           TTAATTGGCAGTGGCATTGAAGTGATGCAAAGATTTCTATGGTTGCAGATAAATCAGAA  
CTTGATTTAGGTATCGGGGTTTGTGGTAAAGAGGGGCAAAGTGTACCTGTTGGCGTAGGA  
CAGCCAGCACTAAAATTGATGAAATTA CTGTTGGTGGAAACAAATTAAGTCATTGTGTAA  
AAGATCACAAAATTCCATTAGAATTGGATTTTTACTGGCAATTTATTCAAATTTTGAT  
AGCCGCTGCGAAATTTATTTCTTTTAAATTATTGAAATT

25

SEC N° ID 14

30

AC ATG TTG AAA AGA ATT TTA GTT AT

SEQ ID NO: 15

35

AGA TCT CAT AAT ACG ACG CGA TTG AGT

SEQ ID NO: 16

40

GTA AAA CGA CGG CCA GT

SEQ ID NO: 17

45

CAG GAA ACA GCT ATG AC

SEQ ID NO: 18

50

GAT AGC CGC TGC GAA ATT TTA

SEQ ID NO: 19

55

CAA AAA AAC CGA ACT TAA TGT TCG

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición de vacuna para uso como medicamento que comprende una cantidad eficaz del polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo constituido por las SEC N° ID 2, 4, 6, 8,10 ó 12, o un fragmento inmunogénico del mismo que tiene al menos 15 aminoácidos contiguos de las SEC N° ID 2, 4, 6, 8, 10 ó 12, en la que dicho fragmento inmunogénico (si es necesario acoplado a un portador) es capaz de originar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de SEC N° ID 2, 4, 6, 8, 10 ó 12, y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 2. Una composición de vacuna según la reivindicación 1, en la que dicho polipéptido o dicho fragmento inmunogénico es parte de una proteína de fusión mayor.

15 3. Una composición de vacuna para uso como medicamento que comprende una cantidad eficaz de una secuencia nucleotídica seleccionada de las SEC N° ID 1, 3, 5, 7, 9 y 11, y un portador farmacéuticamente aceptable.

4. La composición de vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha composición comprende al menos un antígeno distinto de *H. influenzae* no tipable

20 5. Una composición de vacuna según la reivindicación 4, en la que el antígeno de *H. influenzae* no tipable se selecciona de LB 1 (f), OMP26, P6, proteína D, TbpA, TbpB, Hia, Hsf, Hin47, Hif, Hmw1, Hmw2, Hmw3, Hmw4, D15, P2 y P5.

25 6. Uso de una composición que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada de las SEC N° ID 2, 4, 6, 8, 10 ó 12, o un fragmento inmunogénico del mismo que tiene al menos 15 aminoácidos contiguos de las SEC N° ID 2, 4, 6, 8, 10 ó 12, en el que dicho fragmento inmunogénico (si es necesario, acoplado a un portador) es capaz de originar una respuesta inmunitaria que reconoce el polipéptido de las SEC N° ID 2, 4, 6, 8,10 ó 12, en la preparación de un medicamento para uso en la prevención o el tratamiento de la infección.

30 7. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la preparación de un medicamento para uso en la prevención o el tratamiento de la infección.

35 8. Uso de una composición según la reivindicación 6 ó 7 en el que la infección es infección por *H. influenzae* no tipable.

40

45

50

55

60

65

## ES 2 305 111 T3

**Figura 1: Alineamiento de las secuencias polinucleotídicas BASB205**  
 La identidad con la SEC N° ID 1 está indicada por un punto. El hueco se indica por una raya

```

          *      20      *      40      *      60
seqid1  : ATGTTGAAAAGAATTTTAGTTATTATTGGTTTAGCTGTATTAGCAACCGCTTGTTCTAAT : 60
seqid3  : ..... : 60
seqid5  : ..... : 60
seqid7  : ..... : 60
seqid9  : .....G.....A..... : 60
seqid11 : ..... : 60

          *      80      *      100     *      120
seqid1  : GCACCACGAACGGTAAGTCATCAGGTATTTCAGAAAATGATGATATTCAATTAACCTGGT : 120
seqid3  : ..... : 120
seqid5  : ..... : 120
seqid7  : ..... : 120
seqid9  : ..... : 120
seqid11 : ..... : 120

          *      140     *      160     *      180
seqid1  : TTAATTAATAATTTAGAAAAAGATAATCGAACAGGCATTTTTCACAAAGTGAGAACAAC : 180
seqid3  : ..... : 180
seqid5  : ..... : 180
seqid7  : ..... : 180
seqid9  : ..... : 180
seqid11 : ..... : 180

          *      200     *      220     *      240
seqid1  : CGTTCCTCTGCTTTGATGGGCGATAAGGCTCTAGCCAGTGTTTATAATGAATGGGTGGC : 240
seqid3  : .....A..... : 240
seqid5  : .....A..... : 240
seqid7  : .....A..... : 240
seqid9  : .....T..... : 240
seqid11 : .....A..... : 240

          *      260     *      280     *      300
seqid1  : ACTCGCTATCGTATGGGCGGTACGACTAAACGTGGTATTGATTGTTTCAGCATTATGCAA : 300
seqid3  : ..... : 300
seqid5  : ..... : 300
seqid7  : ..... : 300
  
```

# ES 2 305 111 T3

```
seqid9 : ..... : 300
seqid11 : ..... : 300
```

```

          *      320      *      340      *      360
seqid1 : ACTACTTTTCTGAAGTTTTTGGTATTGAATTGCCTCGTTCTACGGCTGAACAGCGTCAT : 360
seqid3 : ..... : 360
seqid5 : ..... : 360
seqid7 : ..... : 360
seqid9 : ..A..... : 360
seqid11 : ..... : 360

```

```

          *      380      *      400      *      420
seqid1 : TTAGGTAGAAAAATTAATAAATCAGAACTAAAAAAGGCGATTAGTTTCTCCGTAAA : 420
seqid3 : ..... : 420
seqid5 : ..... : 420
seqid7 : ..... : 420
seqid9 : ..... : 420
seqid11 : ..... : 420

```

```

          *      440      *      460      *      480
seqid1 : AATAATCACGTTGGTGTTTATATTGGTAATAACCAATTATGCACGCAAGTACAGGGCAA : 480
seqid3 : ..... : 480
seqid5 : ..... : 480
seqid7 : ..... : 480
seqid9 : ..... : 480
seqid11 : ..... : 480

```

```

          *      500      *      520      *      540
seqid1 : GCGGTGACAATAAGTTCCTTGATGAAAAATATTGGGCTAGAACCTACACTCAATCGCGT : 540
seqid3 : ..... : 540
seqid5 : ..... : 540
seqid7 : ..... : 540
seqid9 : ..... : 540
seqid11 : ..... : 540

```

```

          *
seqid1 : CGTATTATGTAA : 552
seqid3 : ..... : 552
seqid5 : ..... : 552

```

## ES 2 305 111 T3

seqid7 : ..... : 552  
seqid9 : ..... : 552  
seqid11 : ..... : 552

## ES 2 305 111 T3

**Figura 2: Alineamiento de las secuencias polipeptídicas BASB205**  
 La identidad con la SEC N° ID 2 está indicada por un punto. El hueco se indica por una raya

```

                *      20      *      40      *      60
seqid2 : MLKRILVIIGLAVLATAACSNAPRTVSHQVISENDDIQLTGGLINNLEKDNRTGIFHKVRTN : 60
seqid4 : ..... : 60
seqid6 : ..... : 60
seqid8 : ..... : 60
seqid10 : .....V..T..... : 60
seqid12 : ..... : 60
  
```

```

                *      80      *      100     *      120
seqid2 : RSSALMGDKALASVYNEWVGTRYRMGGTTKRGIDCSAFMQTTFSEVFGIELPRSTAEQRH : 120
seqid4 : .....N..... : 120
seqid6 : .....N..... : 120
seqid8 : .....N..... : 120
seqid10 : ..... : 120
seqid12 : .....N..... : 120
  
```

```

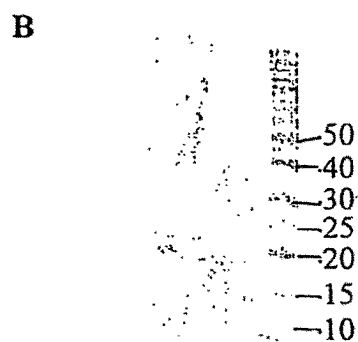
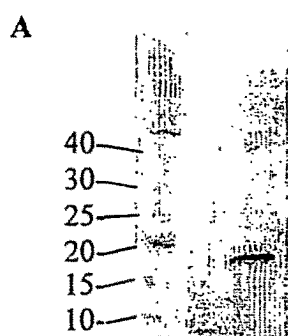
                *      140     *      160     *      180
seqid2 : LGRKINKSELKKGDLVFFFRKNNHVGVIYIGNNQFMHASTGQGVTISSLDEKYWARTYTQSR : 180
seqid4 : ..... : 180
seqid6 : ..... : 180
seqid8 : ..... : 180
seqid10 : ..... : 180
seqid12 : ..... : 180
  
```

```

seqid2 : RIM : 183
seqid4 : ... : 183
seqid6 : ... : 183
seqid8 : ... : 183
seqid10 : ... : 183
seqid12 : ... : 183
  
```

Figura 3A: Gel de SDS-poliacrilamida teñido con Coomassie de proteína BASB205 purificada

Figura 3B: Transferencia Western de proteína BASB205 purificada (anticuerpo anti-His)



## ES 2 305 111 T3

**Figura 4: Predicción de la estructura bidimensional, epítomos de linfocitos B y epítomos de linfocitos T auxiliares de polipéptido BASB205**

```

          *      20      *      40      *      60
seqid2  : MLKRILVIIGLAVLATACSNAPRTVSHQVISENDDIQLTGLINNLEKDNRTGIFHKVRTN : 60
seqid4  : ..... : 60
seqid6  : ..... : 60
seqid8  : ..... : 60
seqid10 : .....V..T..... : 60
seqid12 : ..... : 60
2D Pred : CCCCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCEEECCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
epitopo B: .....BBBBBB.....BBBBBB.....BBBBBBB....BBBB
epitopo T: TTTTTTTTTTTTTTTTTT.....TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

          *      80      *      100     *      120
seqid2  : RSSALMGDKALASVYNEWVGTRYRMGGTTKRGIDCSAFMQTTPSEVFGIELPRSTAEQRH : 120
seqid4  : .....N..... : 120
seqid6  : .....N..... : 120
seqid8  : .....N..... : 120
seqid10 : ..... : 120
seqid12 : .....N..... : 120
2D Pred : CCCCHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCECCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHH
epitopo B: BB.....BBBBBBBBBBBBBBBB.....BBBBBBBB
epitopo T: TTTTTTTTTTTTTT....TTTTTTTTTTTTTT.....TTTTTTTTTTTTTTTTTT....

          *      140     *      160     *      180
seqid2  : LGRKINKSELKKGDLVFFRKNNHVGVIIGNNQFMHASTGQGVTISSLDEKYWARTYTQSR : 180
seqid4  : ..... : 180
seqid5  : ..... : 180
seqid8  : ..... : 180
seqid10 : ..... : 180
seqid12 : ..... : 180
2D Pred : CCCCCHHHHCCCCCEEEECCEEEEBCCCEEEECCEEEECCEEEECCEEEECCEEEEC
epitopo B: BBBBBBBBBBBB.....BBBBBB.....BBBBBBBBBBBBBB
epitopo T: TTTTTTTTTT.....TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT.....TTTTTTTTTT

seqid2  : RIM : 183
seqid4  : ... : 183
seqid6  : ... : 183
seqid8  : ... : 183
seqid10 : ... : 183

```

## ES 2 305 111 T3

seqid12 : ... : 183  
2D Pred : EEC  
epítopo B: BBB  
epítopo T:

H:  $\alpha$ -hélice, E: cadena  $\beta$ , C: espiral

B: epítomos de linfocitos B potenciales

T: epítomos de linfocitos T auxiliares potenciales

# ES 2 305 111 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

	<110> SmithKline Beecham Biologicals S.A.																
	<120> Compuestos novedosos																
5	<130> BM45422																
	<160> 19																
	<170> FastSEQ para Windows versión 4.0																
10	<210> 1																
	<211> 552																
	<212> ADN																
	<213> <i>Haemophilus influenzae</i> no tipable																
15	<220>																
	<221> CDS																
	<222> (1) ... (549)																
20	<400> 1																
	atg	ttg	aaa	aga	att	tta	gtt	att	att	ggg	tta	gct	gta	tta	gca	acc	48
	Met	Leu	Lys	Arg	Ile	Leu	Val	Ile	Ile	Gly	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Thr	
25	1				5					10					15		
	gct	tgt	tct	aat	gca	cca	cga	acg	gta	agt	cat	cag	ggt	att	tca	gaa	96
	Ala	Cys	Ser	Asn	Ala	Pro	Arg	Thr	Val	Ser	His	Gln	Val	Ile	Ser	Glu	
				20					25					30			
30	aat	gat	gat	att	caa	tta	act	ggg	tta	att	aat	aat	tta	gaa	aaa	gat	144
	Asn	Asp	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gly	Leu	Ile	Asn	Asn	Leu	Glu	Lys	Asp	
				35				40					45				
	aat	cga	aca	ggc	att	ttt	cac	aaa	gtg	aga	aca	aac	cgt	tcc	tct	gct	192
35	Asn	Arg	Thr	Gly	Ile	Phe	His	Lys	Val	Arg	Thr	Asn	Arg	Ser	Ser	Ala	
		50					55					60					
	ttg	atg	ggc	gat	aag	gct	cta	gcc	agt	ggt	tat	aat	gaa	tgg	ggt	ggc	240
	Leu	Met	Gly	Asp	Lys	Ala	Leu	Ala	Ser	Val	Tyr	Asn	Glu	Trp	Val	Gly	
40	65					70					75					80	
	act	cgc	tat	cgt	atg	ggc	ggg	acg	act	aaa	cgt	ggg	att	gat	tgt	tca	288
	Thr	Arg	Tyr	Arg	Met	Gly	Gly	Thr	Thr	Lys	Arg	Gly	Ile	Asp	Cys	Ser	
					85					90					95		
45	gca	ttt	atg	caa	act	act	ttt	tct	gaa	ggt	ttt	ggg	att	gaa	ttg	cct	336
	Ala	Phe	Met	Gln	Thr	Thr	Phe	Ser	Glu	Val	Phe	Gly	Ile	Glu	Leu	Pro	
				100					105					110			
	cgt	tct	acg	gct	gaa	cag	cgt	cat	tta	ggg	aga	aaa	att	aat	aaa	tca	384
50	Arg	Ser	Thr	Ala	Glu	Gln	Arg	His	Leu	Gly	Arg	Lys	Ile	Asn	Lys	Ser	
			115					120					125				
	gaa	ctt	aaa	aaa	ggc	gat	tta	ggt	ttc	ttc	cgt	aaa	aat	aat	cac	ggt	432
	Glu	Leu	Lys	Lys	Gly	Asp	Leu	Val	Phe	Phe	Arg	Lys	Asn	Asn	His	Val	
55		130					135					140					
	ggg	ggt	tat	att	ggg	aat	aac	caa	ttt	atg	cac	gca	agt	aca	ggg	caa	480
	Gly	Val	Tyr	Ile	Gly	Asn	Asn	Gln	Phe	Met	His	Ala	Ser	Thr	Gly	Gln	
	145					150					155					160	
60	ggc	gtg	aca	ata	agt	tcc	ctt	gat	gaa	aaa	tat	tgg	gct	aga	acc	tac	528
	Gly	Val	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Asp	Glu	Lys	Tyr	Trp	Ala	Arg	Thr	Tyr	
					165						170				175		
65	act	caa	tcg	cgt	cgt	att	atg	taa									552
	Thr	Gln	Ser	Arg	Arg	Ile	Met										
				180													

ES 2 305 111 T3

<210> 2

<211> 183

<212> PRT

5 <213> *Haemophilus influenzae* no tipable

<400> 2

```

10      Met Leu Lys Arg Ile Leu Val Ile Ile Gly Leu Ala Val Leu Ala Thr
        1           5           10           15
      Ala Cys Ser Asn Ala Pro Arg Thr Val Ser His Gln Val Ile Ser Glu
                20           25           30
15      Asn Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gly Leu Ile Asn Asn Leu Glu Lys Asp
        35           40           45
      Asn Arg Thr Gly Ile Phe His Lys Val Arg Thr Asn Arg Ser Ser Ala
        50           55           60
      Leu Met Gly Asp Lys Ala Leu Ala Ser Val Tyr Asn Glu Trp Val Gly
        65           70           75           80
20      Thr Arg Tyr Arg Met Gly Gly Thr Thr Lys Arg Gly Ile Asp Cys Ser
        85           90
      Ala Phe Met Gln Thr Thr Phe Ser Glu Val Phe Gly Ile Glu Leu Pro
        100           105           110
25      Arg Ser Thr Ala Glu Gln Arg His Leu Gly Arg Lys Ile Asn Lys Ser
        115           120           125
      Glu Leu Lys Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Arg Lys Asn Asn His Val
        130           135           140
30      Gly Val Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Met His Ala Ser Thr Gly Gln
        145           150           155           160
      Gly Val Thr Ile Ser Leu Asp Glu Lys Tyr Trp Ala Arg Thr Tyr
        165           170           175
      Thr Gln Ser Arg Arg Ile Met
        180

```

35

<210> 3

<211> 552

<212> ADN

40 <213> *Haemophilus influenzae* no tipable

<220>

<221> CDS

45 <222> (1) ... (549)

<400> 3

```

50      atg ttg aaa aga att tta gtt att att ggt tta gct gta tta gca acc 48
      Met Leu Lys Arg Ile Leu Val Ile Ile Gly Leu Ala Val Leu Ala Thr
        1           5           10           15
      gct tgt tct aat gca cca cga acg gta agt cat cag gtt att tca gaa 96
      Ala Cys Ser Asn Ala Pro Arg Thr Val Ser His Gln Val Ile Ser Glu
                20           25           30
55      aat gat gat att caa tta act ggt tta att aat aat tta gaa aaa gat 144
      Asn Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gly Leu Ile Asn Asn Leu Glu Lys Asp
        35           40           45
60      aat cga aca ggc att ttt cac aaa gtg aga aca aac cgt tcc tct gct 192
      Asn Arg Thr Gly Ile Phe His Lys Val Arg Thr Asn Arg Ser Ser Ala
        50           55           60
65      ttg atg ggc aat aag gct cta gcc agt gtt tat aat gaa tgg gtt ggc 240
      Leu Met Gly Asn Lys Ala Leu Ala Ser Val Tyr Asn Glu Trp Val Gly
        65           70           75           80

```

# ES 2 305 111 T3

```

act cgc tat cgt atg ggc ggt acg act aaa cgt ggt att gat tgt tca   288
Thr Arg Tyr Arg Met Gly Gly Thr Thr Lys Arg Gly Ile Asp Cys Ser
                        85                               90                               95

5   gca ttt atg caa act act ttt tct gaa gtt ttt ggt att gaa ttg cct   336
Ala Phe Met Gln Thr Thr Phe Ser Glu Val Phe Gly Ile Glu Leu Pro
                        100                               105                               110

10  cgt tct acg gct gaa cag cgt cat tta ggt aga aaa att aat aaa tca   384
Arg Ser Thr Ala Glu Gln Arg His Leu Gly Arg Lys Ile Asn Lys Ser
                        115                               120                               125

15  gaa ctt aaa aaa ggc gat tta gtt ttc ttc cgt aaa aat aat cac gtt   432
Glu Leu Lys Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Arg Lys Asn Asn His Val
                        130                               135                               140

20  ggt gtt tat att ggt aat aac caa ttt atg cac gca agt aca ggg caa   480
Gly Val Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Met His Ala Ser Thr Gly Gln
                        145                               150                               155                               160

25  ggc gtg aca ata agt tcc ctt gat gaa aaa tat tgg gct aga acc tac   528
Gly Val Thr Ile Ser Ser Leu Asp Glu Lys Tyr Trp Ala Arg Thr Tyr
                        165                               170                               175

30  act caa tcg cgt cgt att atg taa   552
Thr Gln Ser Arg Arg Ile Met
                        180

30  <210> 4
    <211> 183
    <212> PRT
35  <213> Haemophilus influenzae no tipable

    <400> 4

40  Met Leu Lys Arg Ile Leu Val Ile Ile Gly Leu Ala Val Leu Ala Thr
    1                               5                               10                               15
Ala Cys Ser Asn Ala Pro Arg Thr Val Ser His Gln Val Ile Ser Glu
    20                               25                               30

45  Asn Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gly Leu Ile Asn Asn Leu Glu Lys Asp
    35                               40                               45
Asn Arg Thr Gly Ile Phe His Lys Val Arg Thr Asn Arg Ser Ser Ala
    50                               55                               60

50  Leu Met Gly Asn Lys Ala Leu Ala Ser Val Tyr Asn Glu Trp Val Gly
    65                               70                               75                               80
Thr Arg Tyr Arg Met Gly Gly Thr Thr Lys Arg Gly Ile Asp Cys Ser
    85                               90                               95

55  Ala Phe Met Gln Thr Thr Phe Ser Glu Val Phe Gly Ile Glu Leu Pro
    100                               105                               110
Arg Ser Thr Ala Glu Gln Arg His Leu Gly Arg Lys Ile Asn Lys Ser
    115                               120                               125

60  Glu Leu Lys Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Arg Lys Asn Asn His Val
    130                               135                               140
Gly Val Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Met His Ala Ser Thr Gly Gln
    145                               150                               155                               160
Gly Val Thr Ile Ser Ser Leu Asp Glu Lys Tyr Trp Ala Arg Thr Tyr
    165                               170                               175

65  Thr Gln Ser Arg Arg Ile Met
    180

```

# ES 2 305 111 T3

<210> 5

<211> 552

<212> ADN

5 <213> *Haemophilus influenzae* no tipable

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)...(549)

<400> 5

```

15      atg ttg aaa aga att tta gtt att att ggt tta gct gta tta gca acc 48
      Met Leu Lys Arg Ile Leu Val Ile Ile Gly Leu Ala Val Leu Ala Thr
          1             5             10             15

20      gct tgt tct aat gca cca cga acg gta agt cat cag gtt att tca gaa 96
      Ala Cys Ser Asn Ala Pro Arg Thr Val Ser His Gln Val Ile Ser Glu
          20             25             30

25      aat gat gat att caa tta act ggt tta att aat aat tta gaa aaa gat 144
      Asn Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gly Leu Ile Asn Asn Leu Glu Lys Asp
          35             40             45

30      aat cga aca ggc att ttt cac aaa gtg aga aca aac cgt tcc tct gct 192
      Asn Arg Thr Gly Ile Phe His Lys Val Arg Thr Asn Arg Ser Ser Ala
          50             55             60

35      ttg atg ggc aat aag gct cta gcc agt gtt tat aat gaa tgg gtt ggc 240
      Leu Met Gly Asn Lys Ala Leu Ala Ser Val Tyr Asn Glu Trp Val Gly
          65             70             75             80

40      act cgc tat cgt atg ggc ggt acg act aaa cgt ggt att gat tgt tca 288
      Thr Arg Tyr Arg Met Gly Gly Thr Thr Lys Arg Gly Ile Asp Cys Ser
          85             90             95

45      gca ttt atg caa act act ttt tct gaa gtt ttt ggt att gaa ttg cct 336
      Ala Phe Met Gln Thr Thr Phe Ser Glu Val Phe Gly Ile Glu Leu Pro
          100            105            110

50      cgt tct acg gct gaa cag cgt cat tta ggt aga aaa att aat aaa tca 384
      Arg Ser Thr Ala Glu Gln Arg His Leu Gly Arg Lys Ile Asn Lys Ser
          115            120            125

55      gaa ctt aaa aaa ggc gat tta gtt ttc ttc cgt aaa aat aat cac gtt 432
      Glu Leu Lys Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Arg Lys Asn Asn His Val
          130            135            140

60      ggt gtt tat att ggt aat aac caa ttt atg cac gca agt aca ggg caa 480
      Gly Val Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Met His Ala Ser Thr Gly Gln
          145            150            155            160

65      ggc gtg aca ata agt tcc ctt gat gaa aaa tat tgg gct aga acc tac 528
      Gly Val Thr Ile Ser Ser Leu Asp Glu Lys Tyr Trp Ala Arg Thr Tyr
          165            170            175

70      act caa tcg cgt cgt att atg taa 552
      Thr Gln Ser Arg Arg Ile Met
          180

```

<210> 6

ES 2 305 111 T3

<211> 183

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae* no tipable

5

<400> 6

```

10      Met Leu Lys Arg Ile Leu Val Ile Ile Gly Leu Ala Val Leu Ala Thr
        1           5           10           15
      Ala Cys Ser Asn Ala Pro Arg Thr Val Ser His Gln Val Ile Ser Glu
        20           25           30
15      Asn Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gly Leu Ile Asn Asn Leu Glu Lys Asp
        35           40           45
      Asn Arg Thr Gly Ile Phe His Lys Val Arg Thr Asn Arg Ser Ser Ala

20
        50           55           60
      Leu Met Gly Asn Lys Ala Leu Ala Ser Val Tyr Asn Glu Trp Val Gly
        65           70           75           80
      Thr Arg Tyr Arg Met Gly Gly Thr Thr Lys Arg Gly Ile Asp Cys Ser
        85           90           95
25      Ala Phe Met Gln Thr Thr Phe Ser Glu Val Phe Gly Ile Glu Leu Pro
        100          105          110
      Arg Ser Thr Ala Glu Gln Arg His Leu Gly Arg Lys Ile Asn Lys Ser
        115          120          125
30      Glu Leu Lys Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Arg Lys Asn Asn His Val
        130          135          140
      Gly Val Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Met His Ala Ser Thr Gly Gln
        145          150          155          160
35      Gly Val Thr Ile Ser Ser Leu Asp Glu Lys Tyr Trp Ala Arg Thr Tyr
        165          170          175
      Thr Gln Ser Arg Arg Ile Met
        180

```

40

<210> 7

<211> 552

45

<212> ADN

<213> *Haemophilus influenzae* no tipable

<220>

50

<221> CDS

<222> (1)...(549)

55

60

65

# ES 2 305 111 T3

<400> 7

```

5      atg ttg aaa aga att tta gtt att att ggt tta gct gta tta gca acc 48
      Met Leu Lys Arg Ile Leu Val Ile Ile Gly Leu Ala Val Leu Ala Thr
      1          5          10          15

10     gct tgt tct aat gca cca cga acg gta agt cat cag gtt att tca gaa 96
      Ala Cys Ser Asn Ala Pro Arg Thr Val Ser His Gln Val Ile Ser Glu
      20          25          30

15     aat gat gat att caa tta act ggt tta att aat aat tta gaa aaa gat 144
      Asn Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gly Leu Ile Asn Asn Leu Glu Lys Asp
      35          40          45

20     aat cga aca ggc att ttt cac aaa gtg aga aca aac cgt tcc tct gct 192
      Asn Arg Thr Gly Ile Phe His Lys Val Arg Thr Asn Arg Ser Ser Ala
      50          55          60

25     ttg atg ggc aat aag gct cta gcc agt gtt tat aat gaa tgg gtt ggc 240
      Leu Met Gly Asn Lys Ala Leu Ala Ser Val Tyr Asn Glu Trp Val Gly
      65          70          75

30     act cgc tat cgt atg ggc ggt acg act aaa cgt ggt att gat tgt tca 288
      Thr Arg Tyr Arg Met Gly Gly Thr Thr Lys Arg Gly Ile Asp Cys Ser
      85          90          95

35     gca ttt atg caa act act ttt tct gaa gtt ttt ggt att gaa ttg cct 336
      Ala Phe Met Gln Thr Thr Phe Ser Glu Val Phe Gly Ile Glu Leu Pro
      100         105         110

40     cgt tct acg gct gaa cag cgt cat tta ggt aga aaa att aat aaa tca 384
      Arg Ser Thr Ala Glu Gln Arg His Leu Gly Arg Lys Ile Asn Lys Ser
      115        120        125

45     gaa ctt aaa aaa ggc gat tta gtt ttc ttc cgt aaa aat aat cac gtt 432
      Glu Leu Lys Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Arg Lys Asn Asn His Val
      130        135        140

50     ggt gtt tat att ggt aat aac caa ttt atg cac gca agt aca ggg caa 480
      Gly Val Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Met His Ala Ser Thr Gly Gln
      145        150        155        160

55     ggc gtg aca ata agt tcc ctt gat gaa aaa tat tgg gct aga acc tac 528
      Gly Val Thr Ile Ser Ser Leu Asp Glu Lys Tyr Trp Ala Arg Thr Tyr
      165        170        175

60     act caa tcg cgt cgt att atg taa 552
      Thr Gln Ser Arg Arg Ile Met
      180

```

55 <210> 8

<211> 183

<212> PRT

60 <213> *Haemophilus influenzae* no tipable

65

ES 2 305 111 T3

<400> 8

5 Met Leu Lys Arg Ile Leu Val Ile Ile Gly Leu Ala Val Leu Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Cys Ser Asn Ala Pro Arg Thr Val Ser His Gln Val Ile Ser Glu  
 20 25 30  
 10 Asn Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gly Leu Ile Asn Asn Leu Glu Lys Asp  
 35 40 45  
 Asn Arg Thr Gly Ile Phe His Lys Val Arg Thr Asn Arg Ser Ser Ala  
 50 55 60  
 15 Leu Met Gly Asn Lys Ala Leu Ala Ser Val Tyr Asn Glu Trp Val Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Tyr Arg Met Gly Gly Thr Thr Lys Arg Gly Ile Asp Cys Ser  
 85 90 95  
 20 Ala Phe Met Gln Thr Thr Phe Ser Glu Val Phe Gly Ile Glu Leu Pro  
 100 105 110  
 Arg Ser Thr Ala Glu Gln Arg His Leu Gly Arg Lys Ile Asn Lys Ser  
 115 120 125  
 Glu Leu Lys Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Arg Lys Asn Asn His Val  
 130 135 140  
 25 Gly Val Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Met His Ala Ser Thr Gly Gln  
 145 150 155 160  
 Gly Val Thr Ile Ser Ser Leu Asp Glu Lys Tyr Trp Ala Arg Thr Tyr  
 165 170 175  
 30 Thr Gln Ser Arg Arg Ile Met  
 180

<210> 9

35 <211> 552

<212> ADN

<213> *Haemophilus influenzae* no tipable

40 <220>

<221> CDS

<222> (1) ... (549)

45 <400> 9

atg ttg aaa aga att tta gtt att gtt ggt tta act gta tta gca acc 48  
 50 Met Leu Lys Arg Ile Leu Val Ile Val Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr  
 1 5 10 15  
 gct tgt tct aat gca cca cga acg gta agt cat cag gtt att tca gaa 96  
 Ala Cys Ser Asn Ala Pro Arg Thr Val Ser His Gln Val Ile Ser Glu  
 20 25 30  
 55 aat gat gat att caa tta act ggt tta att aat aat tta gaa aaa gat 144  
 Asn Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gly Leu Ile Asn Asn Leu Glu Lys Asp  
 35 40 45  
 60 aat cga aca ggc att ttt cac aaa gtg aga aca aac cgt tcc tct gct 192  
 Asn Arg Thr Gly Ile Phe His Lys Val Arg Thr Asn Arg Ser Ser Ala

65

ES 2 305 111 T3

```

          50              55              60
    ttg atg ggc gat aag gct cta gcc agt gtt tat aat gaa tgg gtt ggt   240
    Leu Met Gly Asp Lys Ala Leu Ala Ser Val Tyr Asn Glu Trp Val Gly
      65              70              75              80
5
    act cgc tat cgt atg ggc ggt acg act aaa cgt ggt att gat tgt tca   288
    Thr Arg Tyr Arg Met Gly Gly Thr Thr Lys Arg Gly Ile Asp Cys Ser
      85              90              95
10
    gca ttt atg caa aca act ttt tct gaa gtt ttt ggt att gaa ttg cct   336
    Ala Phe Met Gln Thr Thr Phe Ser Glu Val Phe Gly Ile Glu Leu Pro
      100              105              110
15
    cgt tct acg gct gaa cag cgt cat tta ggt aga aaa att aat aaa tca   384
    Arg Ser Thr Ala Glu Gln Arg His Leu Gly Arg Lys Ile Asn Lys Ser
      115              120              125
20
    gaa ctt aaa aaa ggc gat tta gtt ttc ttc cgt aaa aat aat cac gtt   432
    Glu Leu Lys Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Arg Lys Asn Asn His Val
      130              135              140
25
    ggt gtt tat att ggt aat aac caa ttt atg cac gca agt aca ggg caa   480
    Gly Val Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Met His Ala Ser Thr Gly Gln
      145              150              155
30
    ggc gtg aca ata agt tcc ctt gat gaa aaa tat tgg gct aga acc tac   528
    Gly Val Thr Ile Ser Ser Leu Asp Glu Lys Tyr Trp Ala Arg Thr Tyr
      165              170              175

    act caa tcg cgt cgt att atg taa   552
    Thr Gln Ser Arg Arg Ile Met
      180

```

<210> 10

<211> 183

<212> PRT

<213> *Haemophilus influenzae* no tipable

<400> 10

```

    Met Leu Lys Arg Ile Leu Val Ile Val Gly Leu Thr Val Leu Ala Thr
      1              5              10              15
    Ala Cys Ser Asn Ala Pro Arg Thr Val Ser His Gln Val Ile Ser Glu
      20              25              30
45
    Asn Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gly Leu Ile Asn Asn Leu Glu Lys Asp
      35              40              45
    Asn Arg Thr Gly Ile Phe His Lys Val Arg Thr Asn Arg Ser Ser Ala
      50              55              60
50
    Leu Met Gly Asp Lys Ala Leu Ala Ser Val Tyr Asn Glu Trp Val Gly
      65              70              75              80
    Thr Arg Tyr Arg Met Gly Gly Thr Thr Lys Arg Gly Ile Asp Cys Ser
      85              90
55
    Ala Phe Met Gln Thr Thr Phe Ser Glu Val Phe Gly Ile Glu Leu Pro
      100              105              110
    Arg Ser Thr Ala Glu Gln Arg His Leu Gly Arg Lys Ile Asn Lys Ser
      115              120              125
    Glu Leu Lys Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Arg Lys Asn Asn His Val
      130              135              140
60
    Gly Val Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Met His Ala Ser Thr Gly Gln
      145              150              155
    Gly Val Thr Ile Ser Ser Leu Asp Glu Lys Tyr Trp Ala Arg Thr Tyr
      165              170              175
65
    Thr Gln Ser Arg Arg Ile Met
      180

```

<210> 11

# ES 2 305 111 T3

<211> 552  
 <212> ADN  
 <213> *Haemophilus influenzae* no tipable  
 5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) ... (549)  
 10 <400> 11

```

    atg ttg aaa aga att tta gtt att att ggt tta gct gta tta gca acc 48
    Met Leu Lys Arg Ile Leu Val Ile Ile Gly Leu Ala Val Leu Ala Thr
    1 5 10 15
    gct tgt tct aat gca cca cga acg gta agt cat cag gtt att tca gaa 96
    Ala Cys Ser Asn Ala Pro Arg Thr Val Ser His Gln Val Ile Ser Glu
    20 25 30
    aat gat gat att caa tta act ggt tta att aat aat tta gaa aaa gat 144
    Asn Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gly Leu Ile Asn Asn Leu Glu Lys Asp
    35 40 45
    aat cga aca ggc att ttt cac aaa gtg aga aca aac cgt tcc tct gct 192
    Asn Arg Thr Gly Ile Phe His Lys Val Arg Thr Asn Arg Ser Ser Ala
    50 55 60
    ttg atg ggc aat aag gct cta gcc agt gtt tat aat gaa tgg gtt ggc 240
    Leu Met Gly Asn Lys Ala Leu Ala Ser Val Tyr Asn Glu Trp Val Gly
    65 70 75 80
    act cgc tat cgt atg ggc ggt acg act aaa cgt ggt att gat tgt tca 288
    Thr Arg Tyr Arg Met Gly Gly Thr Thr Lys Arg Gly Ile Asp Cys Ser
    85 90 95
    gca ttt atg caa act act ttt tct gaa gtt ttt ggt att gaa ttg cct 336
    Ala Phe Met Gln Thr Thr Phe Ser Glu Val Phe Gly Ile Glu Leu Pro
    100 105 110
    cgt tct acg gct gaa cag cgt cat tta ggt aga aaa att aat aaa tca 384
    Arg Ser Thr Ala Glu Gln Arg His Leu Gly Arg Lys Ile Asn Lys Ser
    115 120 125
    gaa ctt aaa aaa ggc gat tta gtt ttc ttc cgt aaa aat aat cac gtt 432
    Glu Leu Lys Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Arg Lys Asn Asn His Val
    130 135 140
    ggt gtt tat att ggt aat aac caa ttt atg cac gca agt aca ggg caa 480
    Gly Val Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Met His Ala Ser Thr Gly Gln
    145 150 155 160
    ggc gtg aca ata agt tcc ctt gat gaa aaa tat tgg gct aga acc tac 528
    Gly Val Thr Ile Ser Ser Leu Asp Glu Lys Tyr Trp Ala Arg Thr Tyr
    165 170 175
    act caa tcg cgt cgt att atg taa 552
    Thr Gln Ser Arg Arg Ile Met
    180
  
```

60 <210> 12  
 <211> 183  
 65 <212> PRT  
 <213> *Haemophilus influenzae* no tipable

ES 2 305 111 T3

<400> 12

5 Met Leu Lys Arg Ile Leu Val Ile Ile Gly Leu Ala Val Leu Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Cys Ser Asn Ala Pro Arg Thr Val Ser His Gln Val Ile Ser Glu  
 20 25 30  
 10 Asn Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gly Leu Ile Asn Asn Leu Glu Lys Asp  
 35 40 45  
 Asn Arg Thr Gly Ile Phe His Lys Val Arg Thr Asn Arg Ser Ser Ala  
 50 55 60  
 15 Leu Met Gly Asn Lys Ala Leu Ala Ser Val Tyr Asn Glu Trp Val Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Tyr Arg Met Gly Gly Thr Thr Lys Arg Gly Ile Asp Cys Ser  
 85 90 95  
 20 Ala Phe Met Gln Thr Thr Phe Ser Glu Val Phe Gly Ile Glu Leu Pro  
 100 105 110  
 Arg Ser Thr Ala Glu Gln Arg His Leu Gly Arg Lys Ile Asn Lys Ser  
 115 120 125  
 25 Glu Leu Lys Lys Gly Asp Leu Val Phe Phe Arg Lys Asn Asn His Val  
 130 135 140  
 Gly Val Tyr Ile Gly Asn Asn Gln Phe Met His Ala Ser Thr Gly Gln  
 145 150 155 160  
 Gly Val Thr Ile Ser Ser Leu Asp Glu Lys Tyr Trp Ala Arg Thr Tyr  
 165 170 175  
 30 Thr Gln Ser Arg Arg Ile Met  
 180

<210> 13

<211> 1000

<212> ADN

<213> *Haemophilus influenzae* no tipable

<400> 13

45 atttctgtgt tagtagagga aaatggaaaa cgtgaacgag gaagttgtgg ttctggtggg 60  
 cgtttcggtt tagattgggt ctttgaagtt gttgatggcg atattagagc agtacttttt 120  
 gctaaagaag cggttcgtca agccttagta aaccttagtg cagttgcagc acccgcagga 180  
 ttgatgcctg ttgtgtagg tgcgggttg cggggcgat tgctacacga agcggtaggt 240  
 cacggtttag aaggcgatt taaccgtaaa gaaagttcac tttttacagg caagattggt 300  
 gagcaagtga cttcaccggt atgtacgatt gtggatgatg gcacgattga aaatcgtcga 360  
 50 ggttcactaa ctattgatga tgaaggtgtg ccaagccagt gcaatgtact catcaaagac 420  
 gggattttgc aaggttacat gcaagataaa atgaatgccc gtttgatggg cgttgctcca 480  
 acgggaaatg gacgacgtga gtcttatgcc catttaccac tgcttagaat gactaacacc 540  
 tatatgcttg ctggacaaag tcagtttgat gatttgattg cttctgtaaa acaggggatt 600  
 tatgcaccgc actttggttg agggcaagt gatattacct ctggtaaat tgtattttct 660  
 acttcagaag cctatttaat tgaaaaagga aaaatcacga aaccagttaa gggcgcaact 720  
 55 ttaattggca gtggcattga agtgatgcaa aagatttcta tggttgcaga taaatcagaa 780  
 cttgatttag gtatcggggt ttgtggtaaa gaggggcaaa gtgtacctgt tggcgtagga 840  
 cagccagcac taaaaattga tgaaattact gttggtggaa caaattaagt cattgtgtaa 900  
 aagatcacia aaattccatt agaattggat ttttactggc aattttatc aaattttgat 960  
 60 agccgctgcg aaattttatt tcttttaatt atttgaatt 1000

<210> 14

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

## ES 2 305 111 T3

	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 14	
5	acatgttgaa aagaatttta gttat	25
	<210> 15	
10	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador	
	<400> 15	
20	agatctcata atacgacgcg attgagt	27
	<210> 16	
	<211> 17	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Cebador	
	<400> 16	
35	gtaaacgac ggccagt	17
	<210> 17	
	<211> 17	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador	
	<400> 17	
	caggaaacag ctatgac	17
50	<210> 18	
	<211> 21	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
60	<400> 18	
	gatagccgct gcgaaatttt a	21
65	<210> 19	
	<211> 24	

## ES 2 305 111 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador

<400> 19

10 caaaaaaacc gaactaatg ttcg

24

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65